



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

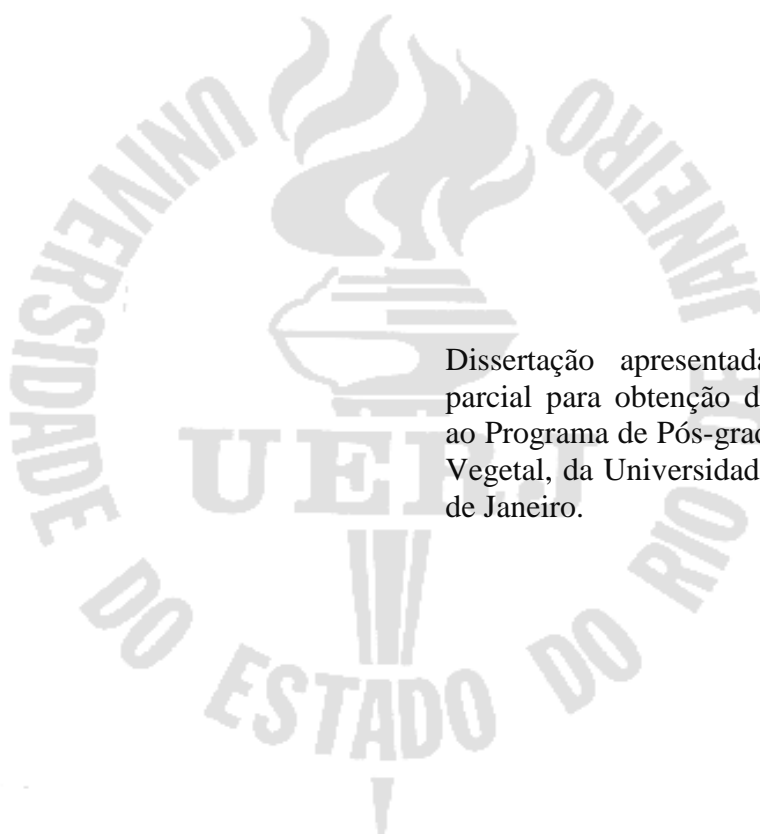
Lívia da Silva Cordeiro

**Produção *in vitro* e criopreservação de raízes de
Cleome rosea Vahl (Capparaceae)**

Rio de Janeiro
2011

Lívia da Silva Cordeiro

**Produção *in vitro* e criopreservação de raízes de
Cleome rosea Vahl (Capparaceae)**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Norma Albarello

Coorientação: Prof^ª. Dr^ª. Claudia Simões

Rio de Janeiro
2011

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

C794 Cordeiro, Livia da Silva.
Produção *in vitro* e criopreservação de raízes de *Cleome rosea*
Vahl (Capparaceae) / Livia da Silva Cordeiro. - 2011.
75 f. : il.
Orientadora: Norma Albarello.
Co-orientação: Claudia Simões.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes.

1. Plantas medicinais – Criopreservação - Teses. 2. Plantas –
Propagação *in vitro* – Teses. I. Albarello, Norma. II. Universidade
do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto
Alcantara Gomes. III. Título.

CDU 633.8

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

Assinatura

Data

Lívia da Silva Cordeiro

**Produção *in vitro* e criopreservação de raízes de
Cleome rosea Vahl (Capparaceae)**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Norma Albarello (Orientadora)
Departamento de Biologia Vegetal / Instituto de Biologia Roberto
Alcantara Gomes / UERJ

Prof^ª. Dr^ª. Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira (PGBV)
Departamento de Biologia Celular / Instituto de Biologia Roberto
Alcantara Gomes / UERJ

Prof^ª. Dr^ª. Georgia Pacheco Peters de Almeida (PGBV)
Departamento de Biologia Celular / Instituto de Biologia Roberto
Alcantara Gomes / UERJ

Prof^ª. Dr^ª. Andrea Furtado Macedo
Departamento de Botânica / Instituto de Biociências / CCBS /
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Rio de Janeiro
2011

DEDICATÓRIA

Ao meu querido pai João (*in memoriam*), pelo apoio constante e convívio com sua sabedoria, humildade, amor e fé.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

Às minhas orientadoras Norma Albarello e Claudia Simões, pelos ensinamentos, dedicação, carinho, paciência, confiança e amizade. Vocês são pessoas que me inspiram.

À Universidade do Estado do Rio de Janeiro e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso e deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN), do Departamento de Biologia Vegetal (DBV/IBRAG/UERJ): Adriana, Analu, Anna Flávia, Brenda, Carlos, Christine, Débora, Fábio, Francesca, Franco, Graziela, Ivan, Joyce, Luciano, Tatiana, Thiago e Victor. Obrigada pelo apoio.

A todos da equipe do Laboratório de Micropropagação e Transformação de Plantas (LABMIT), do Departamento de Biologia Celular (DBCel/IBRAG/UERJ), que com o LABPLAN integra o Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ.

À colega de turma Bianka Soares, pela importante ajuda nos experimentos de biologia molecular.

Às professoras Rachel Fátima Gagliardi de Araujo e Georgia Pacheco Peters de Almeida, do PGBV, pela disponibilidade e sugestões fundamentais para o desenvolvimento do trabalho.

À professora Cátia Henriques Callado e à Técnica em Histologia Jeanne A. T. Glória do Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal (DBV/UERJ), pela infra-estrutura disponibilizada e importante contribuição.

À minha querida família, em especial, minha mãe e minha irmã, Magali e Caroline, pelo apoio e por saberem entender a minha ausência enquanto me dedicava aos estudos. Amo vocês.

A Deus, por todas as bênçãos da minha vida.

Sou, com efeito, vosso servo e filho de vossa serva, um homem fraco, cuja existência é breve, incapaz de compreender vosso julgamento e vossas leis, porque qualquer homem, mesmo perfeito, entre os homens, não será nada, se lhe faltar a sabedoria que vem de vós.

Eclo 9, 5-6

RESUMO

CORDEIRO, Livia da Silva. **Produção *in vitro* e criopreservação de raízes de *Cleome rosea* Vahl (Capparaceae)**. 2011. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

Cleome rosea é uma espécie nativa, de porte herbáceo, ocorrente em restingas brasileiras. Estudos recentes têm revelado o potencial medicinal da espécie para importantes propriedades farmacológicas, como por exemplo, as atividades anti-inflamatória, antígeno-tóxica, antiviral e antibacteriana. Porém, nos últimos anos, *C. rosea* não tem sido encontrada em várias regiões de seu ambiente natural, devido, principalmente, às ações antrópicas. Dessa forma, torna-se relevante o desenvolvimento de métodos de conservação que permitam o estudo e exploração das propriedades medicinais da espécie. O cultivo *in vitro* de raízes representa uma forma eficiente para produção de biomassa, devido ao rápido crescimento, produção estável de metabólitos, além de representar uma potencial fonte de explantes para a propagação em massa de diferentes espécies. O presente trabalho teve como objetivo a produção *in vitro* de culturas de raízes de *C. rosea*, associada à criopreservação, como forma de manutenção em longo prazo das culturas, monitorada através da análise de estabilidade genética. As culturas estabelecidas a partir de explantes radiculares de plantas propagadas *in vitro* de *C. rosea* demonstraram excelente capacidade de multiplicação de raízes em meio de cultura suplementado com o fitorregulador ANA, com manutenção dessa capacidade ao longo de sucessivas subculturas. Associado a esses resultados, o estabelecimento de protocolos de criopreservação pelo método de vitrificação resultou em elevados valores de frequência de recuperação do material após congelamento em nitrogênio líquido com as soluções de vitrificação PVS2 e PVS3. Os estudos de monitoramento da estabilidade genética, pela técnica de marcadores moleculares RAPD, revelaram a presença de polimorfismos significativos em uma das três culturas iniciadas a partir de raízes de *C. rosea* criopreservadas. Esses resultados demonstram as possibilidades de produção de raízes de *C. rosea* e conservação em longo prazo através da criopreservação, iniciando estudos inéditos para a espécie.

Palavras-chave: *Cleome rosea*. Cultura de tecidos. Cultivo *in vitro* de raízes. Criopreservação.

ABSTRACT

Cleome rosea is an herbaceous species found in the restinga vegetation of Brazil. Recent studies have reported its medicinal potential for important pharmacological properties, such as anti-inflammatory, antigenotoxic, antiviral and antibacterial activities. However, in recent years, no *C. rosea* plants have been found in their natural habitat, mainly due to human impact. Thus, it becomes applicable to the development of conservation methods that facilitate the study and exploration of the medicinal properties of *C. rosea*. The *in vitro* roots culture represents an efficient way to produce biomass, due to rapid growth, stable production of metabolites and represent a potential source of explants for mass propagation of different species. This study aimed to produce *in vitro* root cultures of *C. rosea*, associated with cryopreservation, as form of long-term maintenance of cultures, monitored by analysis of genetic stability. Cultures established from root explants of *in vitro* propagated plants of *C. rosea* showed excellent ability to multiplication of roots in culture medium supplemented with NAA plant regulator, maintaining this capacity during successive subcultures. Associated with these results, the establishment of protocols for cryopreservation by vitrification method resulted in high values of recovery frequency of the material after freezing in liquid nitrogen with vitrification solutions PVS2 and PVS3. Studies to monitoring the genetic stability by RAPD technique revealed the presence of significant polymorphisms in one of three cultures initiated from cryopreserved roots of *C. rosea*. These results demonstrate the potential production of roots of *Cleome rosea* and long-term conservation through cryopreservation, starting unpublished studies for the species.

Keywords: *Cleome rosea*. Tissue culture. *In vitro* roots culture. Cryopreservation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- <i>Cleome rosea</i>	22
Figura 2	- Análise histológica dos segmentos excisados de duas regiões de raiz de planta micropropagada de <i>Cleome rosea</i>	25
Figura 3	- Estabelecimento de protocolos de criopreservação, pelo método de vitrificação, para segmentos radiculares produzidos <i>in vitro</i> de <i>C. rosea</i>	28
Figura 4	- Resposta morfogênica de raízes de <i>C. rosea</i> cultivadas <i>in vitro</i> em meio MS0 e suplementado com AIA, com seis semanas de cultivo.....	32
Figura 5	- Raízes de <i>C. rosea</i> cultivadas <i>in vitro</i> em meio MS suplementado com AIB.....	34
Figura 6	- Acúmulo de biomassa em culturas de raízes de <i>C. rosea</i> estabelecidas a partir de segmentos radiculares proximais e medianos, ao longo das subculturas, em meio MS contendo AIB, com seis semanas de cultivo	35
Figura 7	- Espectro de absorção da amostra obtida de cultura de raízes estabelecida em meio suplementado com 0,5 mg.L ⁻¹ de AIB.....	36
Figura 8	- Multiplicação de raízes <i>in vitro</i> de <i>C. rosea</i> a partir de segmentos proximais (esquerda) e segmentos medianos (direita), durante a terceira semana de cultivo em meio MS suplementado com ANA.....	37
Figura 9	- Acúmulo de biomassa em culturas de raízes de <i>C. rosea</i> estabelecidas a partir de segmentos radiculares proximais e medianos, ao longo das subculturas, em meio MS contendo ANA.....	38
Figura 10	- Multiplicação de raízes <i>in vitro</i> de <i>C. rosea</i> , com seis semanas de cultivo em meio MS suplementado com ANA.....	39
Figura 11	- Calogênese a partir de segmentos radiculares de <i>C. rosea</i> cultivados <i>in vitro</i> em meio MS suplementado com 2,4-D.....	39
Figura 12	- Resposta morfogênica de raízes de <i>C. rosea</i> cultivadas <i>in vitro</i> em meio MS suplementado com KIN.....	40
Figura 13	- Resposta morfogênica de raízes de <i>C. rosea</i> após a criopreservação com pré-tratamento e pós-tratamento na ausência de luminosidade e com suplementação com 0,25 mg.L ⁻¹ do fitorregulador ANA, seguida de exposição às soluções de <i>Loading</i> e PVS2.....	43
Figura 14	- Avaliação do acúmulo de biomassa de culturas de raízes de <i>C. rosea</i> obtidas a partir de segmentos radiculares criopreservados com pré-tratamento e pós-tratamento na ausência de luminosidade e com suplementação com 0,25 mg.L ⁻¹ do fitorregulador ANA, seguida de exposição à solução de <i>Loading</i> por 20 minutos e solução PVS2 por 15 minutos.....	45
Figura 15	- Padrões de amplificação por RAPD produzidos com os <i>primers</i> 01 (a), 38 (b) e 60 (c).....	48
Figura 16	- Padrões de amplificação por RAPD produzidos com os <i>primers</i> 10 (a), 12 (b), 16 (c), 29 (d), 31 (e) e 59 (f).....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Efeito dos fitorreguladores ANA, AIB e AIA sobre o crescimento de raízes de <i>C. rosea</i> cultivadas <i>in vitro</i> , a partir de segmentos proximais e medianos, após 6 semanas em meio de cultura MS.....	33
Tabela 2	- Efeito do pré-tratamento e pós-tratamento na recuperação de raízes de <i>C. rosea</i> tratadas com soluções de <i>Loading</i> e PVS2, após seis semanas de inoculação em meio de recultivo.....	42
Tabela 3	- Efeito de diferentes soluções de vitrificação na recuperação de raízes de <i>C. rosea</i> , após seis semanas de inoculação em meio de recultivo.....	44
Tabela 4	- Avaliação da produção de brotos de raízes de <i>C. rosea</i> obtidas a partir de segmentos radiculares criopreservados com pré-tratamento e pós-tratamento na ausência de luminosidade e com suplementação com 0,25 mg.L ⁻¹ do fitorregulador ANA, seguida de exposição à solução de <i>Loading</i> por 20 minutos e solução PVS2 por 15 minutos.....	46
Tabela 5	- Número de produtos de amplificação obtidos com os 60 <i>primers</i> utilizados na triagem inicial.....	47
Tabela 6	- Características dos produtos de amplificação detectados com os nove <i>primers</i> utilizados nas análises RAPD realizadas com culturas de raízes criopreservadas de <i>C. rosea</i>	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIA - Ácido 3-idolil-acético

AIB - Ácido indol-3-butírico

AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism*

ANA - Ácido 1-naftalenoacético

BA - Benzilaminopurina

CTAB - Brometo de cetiltrimetilamônio

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleotídeo trifosfato

2,4-D - Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

EG - Etilenoglicol

FR - Frequência de regeneração

KIN - 6-furfurilaminopurina

MS - Meio de cultura de Murashige & Skoog (1962)

MS0 - Meio de cultura de Murashige & Skoog (1962) sem reguladores de crescimento

NL - Nitrogênio líquido

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PF - peso de matéria fresca

PS - peso de matéria seca

PVS - *Plant Vitrification Solution*

RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*

SAC - Sacarose

TAQ - *Termophilus aquaticus*

TBE - Tampão Tris/Borato/EDTA

VSL - *Vitrification Solution L*

U - Unidade

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	12
1	OBJETIVOS	23
1.1	Geral	23
1.2	Específicos	23
2	MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1	Culturas de raízes	24
2.2	Criopreservação	25
2.2.1	<u>Estabelecimento de protocolos pelo método de vitrificação</u>	25
2.2.2	<u>Técnica de RAPD</u>	29
3	RESULTADOS	31
3.1	Culturas de raízes	31
3.2	Criopreservação	41
3.2.1	<u>Avaliação de protocolos pelo método de vitrificação</u>	41
3.2.2	<u>Análise da estabilidade genética das raízes criopreservadas</u>	47
4	DISCUSSÃO	51
5	CONCLUSÕES	64
6	PERSPECTIVAS	65
	REFERÊNCIAS	66

INTRODUÇÃO

Plantas como fonte de metabólitos especiais

As plantas têm sido reconhecidas como fontes importantes de substâncias biologicamente ativas e sabe-se que a maioria dos fármacos de uso clínico ou são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais. (KOLEWE; GAURAV; ROBERTS, 2008; MCCHESENEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007; SIVAKUMAR, 2006). A diversidade de substâncias químicas de origem vegetal é resultante da interação da biodiversidade com o ambiente, o que teria levado a complexas evoluções bioquímicas nesses organismos. (MCCHESENEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007). Muitas dessas substâncias podem ser classificadas como metabólitos secundários ou especiais. (KOLEWE; GAURAV; ROBERTS, 2008; SANTOS, 2004).

Diversos estudos têm demonstrado que os metabólitos especiais desenvolvem papel importante na adaptação das plantas ao ambiente. Como exemplos de papel que exercem nos vegetais, essas moléculas podem apresentar atividades antibióticas, antifúngicas e antivirais, resultando num grupo de substâncias, as fitoalexinas, responsáveis pela defesa da planta contra patógenos. Também podem atuar sobre o processo germinativo, inibindo-o ou sendo tóxicas para outras plantas, num mecanismo denominado alelopatia; ou ainda exibir um efeito protetor contra a radiação ultravioleta. É devido às suas propriedades biológicas que os metabólitos especiais podem ser aplicados no tratamento de doenças e esse fato tem sido reconhecido pelos séculos de utilização das plantas na medicina tradicional em todo o mundo. (BOURGAUD *et al.*, 2001).

Nos últimos anos, diversos metabólitos especiais de origem vegetal têm sido quimicamente isolados e identificados (KOLEWE; GAURAV; ROBERTS, 2008), dentre os quais destacam-se aqueles dos grupos dos alcaloides, dos fenilpropanoides, dos terpenoides, das quinonas etc, fazendo parte da composição de produtos farmacêuticos, cosméticos, agroquímicos e, mais recentemente, dos nutracêuticos. (ARORA *et al.*, 2009; BOURGAUD *et al.*, 2001; MURTHY; HAHN; PAK, 2008; SRIVASTAVA; SRIVASTAVA, 2007).

Moléculas naturais possuem maior bioatividade e podem oferecer menor risco à saúde humana quando comparadas às drogas sintéticas. (SIVAKUMAR, 2006). Quando a estrutura química de uma substância bioativa é simples, torna-se possível a sua obtenção por meio da síntese química. (KOLEWE; GAURAV; ROBERTS, 2008). Porém, na maioria dos casos, o metabólito de origem vegetal possui uma estrutura complexa e/ou apresenta quiralidade, o que

torna o seu processo de síntese inviável. Sendo assim, a extração diretamente a partir da planta pode ser uma importante alternativa, principalmente quando o material botânico é produzido em grande quantidade. (KOLEWE; GAURAV; ROBERTS, 2008; SRIVASTAVA; SRIVASTAVA, 2007). No entanto, dependendo da espécie, o uso de métodos tradicionais de cultivo requer meses ou anos para se alcançar a época de colheita para a obtenção de quantidades adequadas dos metabólitos especiais, que podem ter seus níveis afetados nas plantas por fatores como patógenos, mudanças climáticas e restrições geográficas, sem contar o custo elevado para extração. (SIVAKUMAR, 2006; SRIVASTAVA; SRIVASTAVA, 2007). Nesse sentido, devido a dificuldades técnicas de cultivo e a razões econômicas, a maioria das plantas com utilidade medicinal tem sido intensamente retirada da natureza. Esse extrativismo vegetal, associado à destruição do ambiente natural pela ação humana, suscita preocupações quanto à diminuição da biodiversidade. (SATO; YAMADA, 2008).

Tendo em vista que a obtenção de metabólitos especiais de interesse, a partir de plantas cultivadas ou ocorrentes em ambientes naturais, nem sempre é satisfatória (MURTHY; HAHN; PAEK, 2008), o uso de estratégias biotecnológicas, como a cultura *in vitro* de células, tecidos, órgãos e organismos vegetais inteiros, tem se mostrado uma alternativa promissora. (KOLEWE; GAURAV; ROBERTS, 2008; RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002).

Cultura de tecidos vegetais

Sistemas de cultivo vegetal *in vitro* têm sido amplamente utilizados e apresentam vantagens como o fornecimento de material vegetal produzido em ambiente controlado, independentemente de variações climáticas ou das condições do solo e livre de micro-organismos e insetos. Além disso, materiais de qualidade definida podem ser produzidos, em espaço reduzido, com aumento de sua produtividade através de seleção de linhagens e otimização das condições de cultivo, com possibilidade de compreensão das vias de síntese de metabólitos e conservação do germoplasma vegetal. (GEORGE, 2008; SATO; YAMADA, 2008).

Culturas *in vitro* iniciam-se a partir de explantes, segmentos de tecidos ou órgãos vegetais, inoculados em meio de cultura artificial visando, entre outras respostas, à regeneração. (GEORGE, 2008; TORRES *et al.*, 2000). Essa regeneração fundamenta-se na

característica de totipotência da célula vegetal, a qual permite manifestar a capacidade de iniciar a formação de novo indivíduo. (TORRES *et al.*, 2000).

A parte da planta da qual o explante é retirado é muito importante no que diz respeito à sua influência sobre o potencial de regeneração. Outros fatores, inerentes às condições de cultivo, que afetam e, até mesmo, determinam as respostas morfogênicas *in vitro*, são: o meio de cultura, através da manipulação das concentrações de sais, vitaminas, reguladores de crescimento etc, e o ambiente físico da cultura, caracterizado pela luminosidade, temperatura, trocas gasosas, consistência do meio de cultura etc. (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998; GEORGE, 2008).

Entre as principais técnicas de cultura de tecidos está a propagação *in vitro* ou micropropagação, que consiste na obtenção de plantas inteiras clonadas sob condições artificiais. A micropropagação pode ser alcançada pela multiplicação de brotos a partir de gemas preexistentes ou pela formação de órgãos, brotos ou embriões a partir de células somáticas. Neste último caso, os processos podem ocorrer de forma direta, a partir de tecidos diferenciados que apresentam potencial morfogenético na planta, ou indireta, quando a regeneração é precedida pela formação de uma massa de células que se multiplica desordenadamente, denominada calo, induzida a partir da dediferenciação das células do explante. (GEORGE; DEBERGH, 2008).

Muitas culturas de materiais vegetais se baseiam no crescimento organizado de tecidos, nas quais a parte do vegetal utilizada para dar início à cultura se mantém preservada. As culturas com crescimento organizado podem ser representadas por sistemas de cultivo de órgãos, tais como brotos e raízes. (GEORGE, 2008).

Cultura de raízes

Por muitos séculos, as raízes das plantas vêm sendo utilizadas na medicina tradicional e suas propriedades terapêuticas têm sido relatadas em diversos registros históricos. (PASQUA *et al.*, 2005). Substâncias de interesse econômico podem ser encontradas em todos os órgãos vegetais, mas muitos estudos indicam que as raízes apresentam altas concentrações de metabólitos especiais com propriedades medicinais (YANIV; BACHRACH, 2002), agroquímicas, cosméticas, condimentares, entre outras. (FULZELE; SATDIVE; POL, 2002). Essa alta concentração de metabólitos especiais em raízes estaria relacionada à sua habilidade

de síntese e/ou armazenamento dessas substâncias, em resposta aos estresses bióticos ou abióticos. (FLORES; VIVANCO; LOYOLA-VARGAS, 1999).

A coleta de raízes produtoras de metabólitos de interesse é uma ação destrutiva para as plantas (SIVAKUMAR, 2006), visto que as raízes possuem um papel vital no crescimento e na produtividade do vegetal (MARTIN *et al.*, 2008) e muitas espécies não se restabelecem após a retirada do órgão. Com isso, torna-se crescente o interesse no desenvolvimento de culturas de raízes *in vitro*. (MARTIN *et al.*, 2008; PASQUA *et al.*, 2005).

Para a produção de metabólitos secundários, o grande desafio está no fato de que a maioria dessas substâncias é produzida por células especializadas. Levando em consideração que, de modo geral, o controle do metabolismo é tecido-específico, culturas mantidas em estado indiferenciado podem perder ou ter sua capacidade biossintética reduzida, enquanto que as culturas de órgãos como raízes e brotos, podem apresentar perfil metabólico comparável ao da planta na natureza, e por isso têm recebido destaque na produção de metabólitos *in vitro*. (KARUPPUSAMY, 2009; MURTHY; HAHN; PAEK, 2008; SRIVASTAVA; SRIVASTAVA, 2007; VERPOORTE; CONTIN; MEMELINK, 2002).

Os sistemas de cultivo de raízes podem ser iniciados a partir de diferentes tipos de explantes: radiculares, foliares e caulinares, podendo se desenvolver via organogênese direta ou mediada pelo surgimento de calos. Quando foram estabelecidas as primeiras culturas de raízes, entre as décadas de 40 e 50, os objetivos concentravam-se em utilizá-las como ferramentas experimentais para estudos de nutrição vegetal, sendo poucos aqueles que investigavam o metabolismo secundário. A partir da década de 50, as culturas de raízes perderam destaque como sistemas experimentais diante do desenvolvimento de culturas de células em suspensão de diversas espécies. (VIVANCO; GUIMARÃES; FLORES, 2002). O interesse por culturas de raízes, principalmente para a produção de metabólitos, voltou a ficar em evidência nas últimas décadas, através do desenvolvimento e melhoria das técnicas de culturas de raízes transformadas geneticamente (*hairy roots*), usando *Agrobacterium rhizogenes*, e de raízes não transformadas, pela manipulação do meio de cultura. (MARTIN *et al.*, 2008; PASQUA *et al.*, 2005).

Estudos demonstram que culturas de raízes não transformadas necessitam da suplementação de fitorreguladores para estimular o crescimento, ao passo que as culturas do tipo *hairy roots* podem crescer ativamente em meio de cultura sem fitorreguladores. (KOLEWE; GAURAV; ROBERTS, 2008; MARTIN *et al.*, 2008; SIVAKUMAR, 2006). No entanto, dependendo da região onde os segmentos de T-DNA serão integrados ao genoma, raízes transformadas podem apresentar um aspecto anormal. (SUDHA; SEENI, 2001). Vale

destacar também que as culturas do tipo *hairy roots* produzem substâncias conhecidas como opinas, as quais são tóxicas para células de mamíferos. Esse fato dificulta a utilização de extratos de *hairy roots*, uma vez que o custo para purificação e eliminação das opinas é elevado. (CHOI *et al.*, 2000; CUI *et al.*, 2010; GAO *et al.*, 2005; PAEK; CHAKRABARTY; HAHN, 2005).

Nesse contexto, o potencial das culturas de raízes não transformadas tem sido cada vez mais explorado (MURTHY; HAHN; PAEK, 2008; PAEK; CHAKRABARTY; HAHN, 2005), funcionando como método alternativo para espécies recalcitrantes à infecção com *A. rhizogenes* (SUDHA; SEENI, 2001), bem como para propagação *in vitro* de diversas espécies vegetais e conservação do germoplasma. (CUI *et al.*, 2010; GOEL; KUKREJA; BISHT; 2009; NANDAGOPAL; RANJITHA KUMARI, 2007; SIMÕES *et al.*, 2009b; SUBOTIC; JEVREMOVIC; GRUBISIC, 2009; SUBOTIC *et al.*, 2009; SUDHA; SEENI, 2006).

Adicionalmente, as culturas de raízes podem ser utilizadas como modelo em pesquisas voltadas para a compreensão dos efeitos de reguladores de crescimento, nutrientes do meio de cultura e diferentes variações no ambiente físico sobre a organogênese e a embriogênese somática. (KOLLÁROVÁ *et al.*, 2004; NANDAGOPAL; RANJITHA KUMARI, 2007; SUBOTIC; JEVREMOVIC; GRUBISIC, 2009; SUBOTIC *et al.*, 2009). Esta técnica de cultivo *in vitro* viabiliza o rápido crescimento e produção de diversos metabólitos de importância para a saúde humana. Dessa forma, essas culturas constituem um excelente material biológico para a produção estável de substâncias bioativas, devido às facilidades no cultivo e à ausência de modificações genéticas no genoma da planta. (MARTIN *et al.*, 2008; SIVAKUMAR, 2006).

Tendo em vista a importância da técnica de culturas de raízes, métodos de conservação, como a criopreservação, devem ser estabelecidos para esses sistemas.

Criopreservação

Fundamentação teórica

A manutenção de culturas vegetais *in vitro* requer, na maioria dos casos, subculturas periódicas, tornando esse processo de conservação suscetível a erros e contaminações; dispendioso, por requerer mão de obra especializada e favorável à perda da estabilidade fenotípica e genotípica do germoplasma vegetal. (XUE *et al.*, 2008; SANTOS, 2000).

Portanto, torna-se necessário o uso de um sistema de conservação, em longo prazo, do material vegetal utilizado em culturas *in vitro*.

Nas últimas décadas, a criopreservação tem sido empregada de forma eficiente no armazenamento de germoplasma vegetal em longo prazo, utilizando um mínimo de espaço e manutenção. (SAKAI; ENGELMANN, 2007). A criopreservação é definida como a conservação de material biológico (células, tecidos, órgãos e organismos viáveis) a temperaturas ultra-baixas em nitrogênio líquido (-196 °C) ou em sua fase de vapor a -150°C (BENSON, 2008b; SANTOS, 2000;). A estas temperaturas, os únicos estados físicos existentes são o cristalino e o vítreo, nos quais a viscosidade é muito elevada, a energia cinética e difusão molecular se tornam reduzidas e as reações metabólicas são retardadas ou cessadas. (SANTOS, 2000). Portanto, à temperatura do nitrogênio líquido, o material vegetal pode ser armazenado sem alterações por um período de tempo, teoricamente, ilimitado. (ENGELMANN, 2010).

Os primeiros protocolos de criopreservação vegetal começaram a ser desenvolvidos na década de 70, tendo como contribuição estudos realizados no início do século XX, os quais demonstraram os efeitos do congelamento em plantas. (BENSON, 2004). A metodologia de criopreservação mais utilizada tem como base o congelamento lento do material até uma temperatura definida utilizando refrigeradores programáveis, seguido pela imersão em nitrogênio líquido. Durante o lento resfriamento dos explantes, ocorre primeiramente a formação de gelo no meio extracelular e, como resultado, saída de água do meio interno em resposta à diferença de pressão de vapor entre os ambientes celulares. A condição ideal para esse tipo de protocolo se resume na utilização de uma taxa de resfriamento que remova a maior parte da água congelável das células, sem, no entanto, resultar em danos devido à concentração dos solutos celulares. (ENGELMANN, 2010).

Os protocolos baseados no resfriamento lento apresentam limitações, principalmente para estruturas diferenciadas, que apresentam composição celular variada e requerem condições específicas de desidratação induzida por congelamento. (ENGELMANN, 2010). Nesse sentido, trabalhos iniciados a partir do fim da década de 80 se concentram em desenvolver procedimentos criogênicos que eliminem a necessidade de congelamento controlado e as possibilidades de danos causados pela cristalização da água intra e extracelular. (SAKAI, 2004; SAKAI; ENGELMANN, 2007).

Nos últimos anos, técnicas como vitrificação, encapsulamento-desidratação e encapsulamento-vitrificação têm sido desenvolvidas, contribuindo para um considerável aumento no número de espécies criopreservadas. Essas novas técnicas baseiam-se na remoção

da maior quantidade de água congelável que existe nas células, através da exposição a soluções altamente concentradas ou da dessecação por fluxo de ar. Esse procedimento torna o citoplasma suficientemente concentrado antes do congelamento, que deve ser realizado de forma ultrarrápida através da imersão direta em nitrogênio líquido. (SAKAI; ENGELMANN, 2007; TAYLOR; SONG; BROCKBANK, 2004).

O termo vitrificação se refere ao processo físico pelo qual soluções altamente concentradas e viscosas são resfriadas abaixo de sua temperatura de congelamento e atingem o estado vítreo, definido como o estado amorfo ou estado metaestável não cristalino de um sólido. (COLLARES; KIECKBUSCH; FINZER, 2002; SAKAI; ENGELMANN, 2007; SANTOS, 2000). Esse processo ocorre porque a alta viscosidade dessas soluções restringe a habilidade das moléculas de água de se rearranjar em forma de cristais. Além disso, a viscosidade de soluções altamente concentradas tende a aumentar durante o resfriamento, impedindo ainda mais a mobilidade molecular da água. No estado vítreo as soluções supersaturadas e viscosas apresentam arranjo molecular aleatório de um líquido, com propriedades físicas similares as de um sólido. (BENSON *et al.*, 2006; SANTOS, 2000).

No geral, os protocolos de criopreservação pelo método de vitrificação requerem a aplicação de soluções altamente concentradas, que podem conter açúcares como sacarose, trealose e glicose ou aminoácidos como prolina, os quais promoverão a desidratação osmótica das células, resultando em elevação da concentração do protoplasma e contribuindo assim para a formação do estado vítreo durante a imersão em nitrogênio líquido. (SAKAI, 2004; SANTOS, 2000). Além disso, os açúcares também atuam na estabilização de macromoléculas celulares durante o congelamento. (SANTOS, 2000). Outras substâncias crioprotetoras (glicerol, dimetilssulfóxido, etilenoglicol etc) fazem parte da composição química de uma série de soluções de vitrificação, conhecidas como PVS (*Plant Vitrification Solution*). (BENSON, 2008a). Estudos físico-químicos sugerem que esses componentes apresentam uma forte interação com a água, o que resulta em redução do ponto de fusão, da mobilidade das moléculas de água e, portanto, das chances de cristalização. (MURTHY, 1998). Em resumo, a metodologia de vitrificação restringe a difusão de substratos e produtos dentro da célula, previne o colapso tecidual, a concentração de solutos celulares e a alteração do pH na célula desidratada, levando a um estado de quiescência metabólica. (SAKAI, 2004; SANTOS, 2000).

O método de encapsulamento-desidratação baseia-se no encapsulamento dos explantes em uma matriz de alginato de sódio, desidratação em soluções contendo sacarose e/ou dessecação evaporativa em fluxo laminar ou em sílica gel. Em seguida, as cápsulas são

imersas em nitrogênio líquido. (BENSON, 2008a; SANTOS, 2000). Essa técnica tem sido amplamente utilizada devido às suas vantagens como: facilidade no manuseio dos explantes, simplificação do meio crioprotetor, proteção dos materiais mais frágeis etc. (SANTOS, 2000).

A partir da combinação das vantagens dos métodos de vitrificação e de encapsulamento-desidratação, surgiu o método de encapsulamento-vitrificação. (BENSON, 2008a; SAKAI; ENGELMANN, 2007). Esse processo descarta os longos períodos de tratamentos de desidratação requeridos no método de encapsulamento-desidratação e evita as dificuldades de se trabalhar com um grande número de explantes pequenos, durante as etapas rápidas e precisas do método de vitrificação. (SAKAI; ENGELMANN, 2007).

Várias técnicas de criopreservação têm sido desenvolvidas e utilizadas com muitas espécies, demonstrando sucesso na conservação de brotos, calos, embriões somáticos etc. No caso da criopreservação de raízes, embora ainda seja reduzido o número de trabalhos descritos na literatura, tem sido crescente a atenção voltada para esse tipo de material, uma vez que as raízes apresentam grande potencial para estabelecimento de sistemas produtores de metabólitos especiais, bem como para conservação de germoplasma. Até o momento, existem estudos de criopreservação bem sucedidos com *hairy roots* de numerosas plantas medicinais. (BENSON; HAMILL, 1991; HIRATA *et al.*, 2002; LAMBERT *et al.*, 2009; TEOH *et al.*, 1996; XUE *et al.*, 2008; YOSHIMATSU; YAMAGUCHI; SHIMOMURA, 1996). No entanto, poucos são os trabalhos que apresentam a aplicação de técnicas de criopreservação com raízes não transformadas geneticamente. (JUNG *et al.*, 2001; OH *et al.*, 2009).

Estabilidade genética

A manutenção da estabilidade genética de materiais criopreservados é de extrema importância para esse tipo de conservação. (RYYNÄNEN; ARONEN, 2005). É necessário considerar que os procedimentos para a criopreservação podem causar estresse, danos de diferentes tipos (físico, químico e fisiológico) e variação somaclonal, os quais podem revelar-se como alterações morfológicas, cromossômicas, de expressão gênica, de perfil proteico ou de sequência de DNA. (HARDING, 2004). No entanto, essas possíveis variações podem não ser devido ao congelamento, mas sim resultantes das condições de cultura *in vitro*, crioproteção e regeneração, de forma associada. (MARTÍN; GONZÁLEZ-BENITO, 2005).

Diversos estudos têm demonstrado que a exposição do material vegetal a soluções de vitrificação altamente concentradas é potencialmente danosa à viabilidade celular, devido aos efeitos tóxicos dos seus componentes individualmente ou aos efeitos osmóticos dessas soluções. (HALMAGY; PINKER, 2006; KAMI *et al.*, 2008; VOLK; HARRIS; ROTINDO,

2006). Um dos componentes das soluções de vitrificação é o DMSO, considerado em vários trabalhos como indutor de mudanças genéticas. (MARTÍN; GONZÁLEZ-BENITO, 2005; MÜLLER *et al.*, 2007). Esses fatos corroboram a necessidade de se estudar a estabilidade genética de materiais tratados com soluções crioprotetoras. (RYYNÄNEN; ARONEN, 2005).

O objetivo da conservação de recursos genéticos vegetais não é somente armazenar germoplasma, mas também minimizar os riscos de possíveis variações durante a conservação. Qualquer método de conservação pode ser utilizado, preferencialmente aqueles em que o material vegetal mantenha-se geneticamente estável. Análises de variações genéticas podem envolver investigações de crescimento e desenvolvimento, funções fisiológicas e marcadores moleculares. (LIU; WANG; LIU, 2004; RYYNÄNEN; ARONEN, 2005).

Um marcador molecular é uma sequência de DNA que é facilmente detectada e monitorada. Seu uso é baseado na detecção de polimorfismos no DNA (KUMAR *et al.*, 2009). Os marcadores moleculares mais utilizados nos estudos de estabilidade genética após procedimentos de criopreservação são o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e o SSR (*Simple Sequence Repeat*), cujas técnicas são baseadas em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), são altamente polimórficos e sensíveis à detecção de variações genéticas. (HARDING, 2004; HARDING; JOHNSTON; BENSON, 2005; LIU; WANG; LIU, 2004; MÜLLER *et al.*, 2007).

RAPD, ou polimorfismo de DNA amplificado ao acaso, é uma técnica baseada na amplificação enzimática de segmentos de DNA com oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) de sequências arbitrárias. (ARIF *et al.*, 2010; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Nessa reação, um *primer* único se anela ao DNA genômico em dois ou mais sítios complementares, formando produtos de amplificação. Esses produtos são visualizados sob luz ultravioleta, após a separação em gel de agarose, e os polimorfismos analisados através da presença ou ausência de bandas. (KUMAR *et al.*, 2009). Esse marcador reúne a simplicidade técnica da visualização direta dos marcadores isoenzimáticos com o poder de resolução dos marcadores de DNA, podendo ser utilizado em experimentos típicos de programas de melhoramento, análises de diversidade genética e caracterização de bancos de germoplasma. (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Quanto ao marcador molecular AFLP, conhecido como polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados, sua técnica é baseada na amplificação seletiva de fragmentos gerados após digestão com enzimas específicas. Nesse caso, os polimorfismos são detectados pelas diferenças no comprimento dos fragmentos através de eletroforese em gel de poliacrilamida. (KUMAR *et al.*, 2009). Essa técnica associa a especificidade, a resolução e o

poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição à velocidade e praticidade da detecção dos polimorfismos via PCR. (CASTILLO *et al.*, 2010; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Entretanto, sua metodologia e análise dos dados requerem estrutura não disponível em muitos laboratórios. (ARIF *et al.*, 2010).

Os marcadores do tipo SSR, ou microssatélites, são sequências curtas repetidas e amplamente distribuídas no genoma das plantas. Por serem marcadores codominantes e altamente polimórficos, têm sido considerados ideais para avaliar a estabilidade genética após a criopreservação. (HARDING, 2004). No entanto, essa técnica requer o desenvolvimento prévio de *primers* específicos, mão de obra especializada e equipamentos sofisticados.

Sendo assim, a conservação através da criopreservação com o monitoramento da estabilidade genética constitui uma metodologia eficiente para a conservação de espécies medicinais.

***Cleome rosea* Vahl**

O Gênero *Cleome* é o segundo em número de espécies na família Capparaceae, depois de *Capparis*, apresentando aproximadamente cerca de 200 espécies. (CRONQUIST, 1981). Compreende principalmente plantas herbáceas e, mais raramente, arbustivas. No Brasil, o gênero está representado por 28 espécies amplamente distribuídas de norte a sul do país. São conhecidas como mussambê e, devido à beleza de suas flores, algumas espécies são cultivadas como plantas de jardim. (COSTA E SILVA, 2000).

A classificação do gênero *Cleome*, assim como da própria família Capparaceae, tem sido discutida com base nos estudos de sistemática molecular de plantas iniciados nos anos 90, que resultaram em propostas significativas de mudanças na taxonomia, fundamentadas no estabelecimento de grupos naturais autênticos ou monofiléticos. (SCHUH, 2000). Levando em consideração as relações filogenéticas e morfológicas, alguns autores sugerem a inclusão de Capparaceae na família Brassicaceae, subfamília Capparoidae (JUDD *et al.*, 2002); outros recomendam a inclusão do gênero em Brassicaceae, subfamília Cleomoidea (SÁNCHEZ-ACEBO, 2005), enquanto uma outra linha reconhece a existência de três famílias distintas: Brassicaceae, Capparaceae e Cleomaceae (HALL; SYTSMA; ILTIS, 2002).

Cleome rosea (Figuras 1a e 1b) é uma espécie nativa encontrada nas restingas dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo. (CARVALHO, 2002; COSTA & SILVA, 2000; MARTINS *et al.*, 2008). Os primeiros estudos *in vitro* foram realizados no Núcleo de

Biotecnologia Vegetal da UERJ, onde foram definidos protocolos de micropropagação (Figura 1c) por organogênese (SIMÕES *et al.*, 2004; 2009b), embriogênese somática (SIMÕES *et al.*, 2010b), culturas de calos e células em suspensão produtoras e não produtoras de antocianinas (SIMÕES *et al.*, 2009a) e culturas de raízes (SIMÕES *et al.*, 2009b), demonstrando o alto potencial morfogênico da espécie.

No Brasil, poucas espécies do gênero *Cleome* têm sido estudadas quanto a atividades medicinais. Extratos de *C. rosea* obtidos a partir de material cultivado *in vivo* e *in vitro* têm sido investigados quanto ao potencial medicinal, com resultados positivos em relação às atividades antioxidante e antiinflamatória (SIMÕES *et al.*, 2006), antiviral (SIMÕES *et al.*, 2010a) e antibacteriana (trabalho submetido à publicação). Esses resultados têm estimulado a pesquisa de novas atividades biológicas com a espécie, bem como a definição de metodologias de conservação, considerando sua ocorrência em regiões de restinga. Os ecossistemas que compõem as restingas têm sido submetidos a um intenso processo de degradação de suas características naturais, devido principalmente à especulação imobiliária, queimadas, retirada ilegal de areia e invasão de espécies exóticas (ESTEVEZ; LACERDA, 2000; KLEIN; CITADINI-ZANETTE; SANTOS, 2007), o que certamente vem comprometendo o estabelecimento e a preservação de espécies ocorrentes nestes ambientes.

Pelo exposto, o presente trabalho visa à realização de estudos de produção e manutenção *in vitro* de raízes de *C. rosea*, bem como o estabelecimento de protocolos para conservação em longo prazo desse material, monitorados por análise de estabilidade genética. Até o momento, nenhum estudo de criopreservação e monitoramento genético de culturas produzidas *in vitro* foi realizado com *C. rosea*, sendo esta proposta inédita para a espécie estudada.



Figura 1 - *Cleome rosea*. a) Inflorescência; b) *Habitus* de *C. rosea* na restinga de Itaipuaçu, RJ; c) Plantas de *C. rosea* propagadas *in vitro*. Barra: 1,00 cm. Fotos: Claudia Simões e Dulce Campos.

1 OBJETIVOS

1.1 GERAL

Definir um protocolo para a produção *in vitro* e criopreservação de raízes de *Cleome rosea* e realizar o monitoramento genético do material.

1.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a influência de diferentes fitorreguladores sobre a multiplicação das raízes sob condição *in vitro*;
- ✓ Avaliar diferentes protocolos de vitrificação na criopreservação de *Cleome rosea* visando à conservação em longo prazo das raízes produzidas;
- ✓ Monitorar a estabilidade genética, por meio da técnica de RAPD, das raízes obtidas após a criopreservação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de cultura de tecidos, criopreservação e monitoramento da estabilidade genética foram realizados nos laboratórios do Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ. Um exemplar representativo da espécie está depositado no Herbário da UERJ sob número de registro HRJ 7185.

2.1 Culturas de raízes

As culturas de raízes foram iniciadas a partir de plantas micropropagadas de *Cleome rosea* (SIMÕES *et al.*, 2009b) com aproximadamente 45 dias, mantidas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sem a suplementação de fitorreguladores. Cinco segmentos radiculares (0,4 - 0,5 cm de comprimento) desprovidos de raízes laterais foram excisados a partir de duas regiões das raízes: regiões medianas (4-5 cm antes do ápice radicular) (Figura 2a) e regiões proximais (5-6 cm a partir do caule) (Figura 2b). Os segmentos foram inoculados em frascos do tipo erlenmeyer (50 mL), vedados com tampa dupla de folha de alumínio. Os frascos continham 20 mL de meio de cultura MS líquido acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose e suplementado com os fitorreguladores ANA, AIB, AIA, 2,4-D e KIN nas concentrações de 0,25; 0,50 e 1,0 mg.L⁻¹. Culturas estabelecidas em meio MS0 foram utilizadas como controle.

Os meios de cultura tiveram os seus valores de pH ajustados para 5,8 antes da autoclavagem (121° C por 15 min). As culturas foram mantidas em câmara de crescimento a 26 ± 2°C, com intensidade luminosa de 45µmol.m⁻².s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas, sob fotoperíodo de 16 horas e em mesa giratória orbital (100 rpm). Ao final de seis semanas, as culturas eram subcultivadas para meio fresco de igual composição, sendo utilizados cinco segmentos radiculares (0,4 - 0,5 cm de comprimento), desprovidos de raízes laterais, para dar início às novas culturas.

A cada subcultura foram realizadas análises relativas aos pesos de matéria fresca (PF) e seca (PS). Para a determinação do PS as raízes foram dessecadas em estufa a 45°C até atingir peso constante. As avaliações foram realizadas em três replicatas por tratamento e os experimentos foram repetidos três vezes. A análise estatística foi realizada com o uso do software GraphPad Prism 5. Análises de variância foram realizadas por ANOVA e as diferenças significativas entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5 %.

A determinação da natureza química da substância de coloração amarela produzida nas culturas de raízes foi realizada por espectrofotometria. As raízes (1,0 g de matéria fresca) foram submetidas à extração por 24 horas a 4°C em acetona PA (10 mL). Em seguida a solução foi filtrada em papel (Whatman nº 2) e analisada em espectrofotômetro (Shimadzu UV - 160) em comprimentos de onda entre 300 a 600 nm.

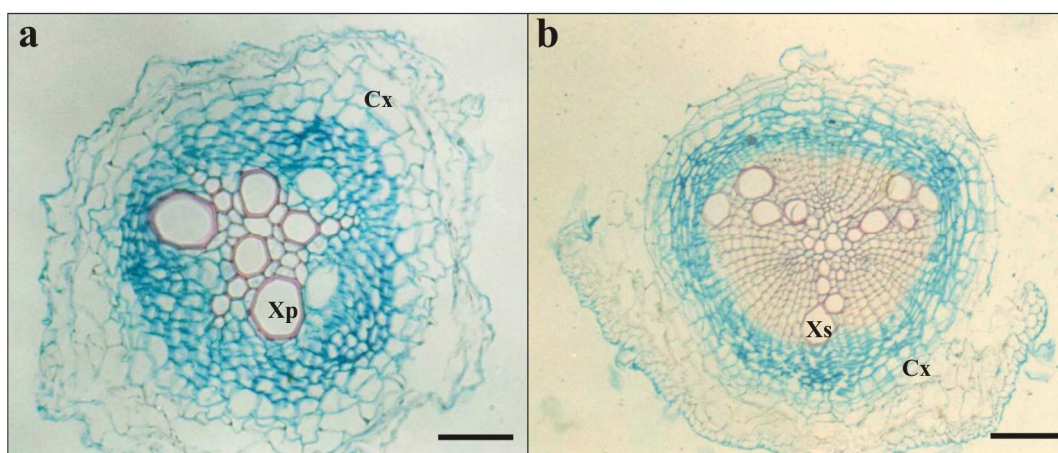


Figura 2 - Análise histológica dos segmentos excisados de duas regiões de raiz de planta micropropagada de *Cleome rosea*: a) região mediana; b) região proximal. Cx= córtex; Xp= xilema primário; Xs= xilema secundário. Barras: 150 µm. Fotos: Cláudia Simões.

2.2 Criopreservação

2.2.1 Estabelecimento de protocolos pelo método de vitrificação

a) Pré-tratamento, vitrificação e congelamento

Para a criopreservação, foram utilizados segmentos (0,4 - 0,5 cm de comprimento) de regiões proximais de raízes de plantas micropropagadas de *C. rosea* com aproximadamente 45 dias de cultivo. Ensaio preliminares evidenciaram que os segmentos radiculares obtidos a partir de regiões de menor espessura são pouco resistentes à manipulação durante os procedimentos de criopreservação pela técnica de vitrificação. Dessa forma, no presente estudo, foram utilizados somente segmentos proximais com aproximadamente 0,1 cm de espessura. Os segmentos foram submetidos aos protocolos de vitrificação descritos abaixo e esquematizados na figura 3.

O pré-tratamento foi realizado em meio MS líquido, suplementado ou não com o fitorregulador ANA (0,25 ou 1,0 mg.L⁻¹) em concentrações crescentes de sacarose (0,2 e 0,4 M) a cada 2 dias. Os tratamentos foram realizados na ausência ou presença de luz (45

$\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ /fotoperíodo de 16 h) e a temperatura de $26\pm 2^\circ\text{C}$. Nessa etapa, os segmentos (50 segmentos/frasco) foram inoculados em frascos de vidro (6,5 cm x 8,3 cm) vedados com tampa de polipropileno, contendo 50 mL de meio e mantidos em mesa giratória orbital (100 rpm).

Após o pré-tratamento, os segmentos (5 segmentos/criotubo) foram transferidos para criotubos (2 mL, Nalgene) contendo 1,0 mL de solução de *Loading* (2,0 M de glicerol e 0,4 M de sacarose, segundo Nishizawa *et al.*, 1993), preparada em meio MS, na qual permaneceram por 20 minutos. Em seguida, a solução de *Loading* foi removida e os segmentos foram imersos em 1,0 mL de uma das seguintes soluções de vitrificação preparadas em meio MS: PVS2 (30% de glicerol, 15% de etilenoglicol, 15% de DMSO e 0,4 M de sacarose), segundo Sakai, Kobayashi e Oiyama (1990); PVS3 (50% de glicerol e 50% de sacarose), segundo Nishizawa *et al.* (1993) ou VSL (20% de glicerol, 30% de etilenoglicol, 10% de DMSO, 5% de sacarose e 10 mM CaCl_2), de acordo com Suzuki *et al.* (2008). Os tratamentos foram realizados em diferentes tempos de exposição: 15, 30, 45 ou 60 minutos. Alguns experimentos foram realizados sem a etapa de exposição à solução de *Loading*. Nesse caso, os explantes foram transferidos, após o pré-tratamento, para criotubos e submetidos a um dos tratamentos de vitrificação citados.

Após as etapas descritas anteriormente, a solução de vitrificação foi substituída por 1,0 mL de nova solução, de igual composição e os criotubos foram vedados e armazenados em nitrogênio líquido por, no mínimo, 1 hora.

b) Descongelamento e Recuperação

O descongelamento foi realizado a $38\pm 2^\circ\text{C}$ por 2-3 minutos, pela imersão dos criotubos em banho-maria. Em seguida, a solução de vitrificação foi imediatamente retirada dos criotubos e os segmentos foram lavados e incubados em 1,0 mL de meio MS acrescido de 1,2 M de sacarose, por 30 minutos.

Antes de serem inoculados em meio de recultivo, os segmentos foram submetidos a pós-tratamento: meio MS líquido suplementado ou não com ANA nas concentrações de $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ ou $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, acrescido de sacarose nas mesmas concentrações que foram utilizadas no pré-tratamento, porém de forma decrescente, durante 2 dias em cada concentração, na ausência ou presença de luz ($45 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ /fotoperíodo de 16 h). Em seguida, os segmentos foram inoculados em meio de recultivo: 20 mL de MS líquido acrescido de 30 g.L^{-1} de sacarose e suplementado com o fitorregulador ANA ($0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ ou $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$). As culturas foram preparadas em frascos erlenmeyers (50 mL) (5

segmentos/frasco), vedados com tampa dupla de folha de alumínio, e mantidas em câmara de crescimento a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, com intensidade luminosa de $45\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas, sob fotoperíodo de 16 horas e em mesa giratória orbital (100 rpm).

Para avaliar o efeito dos tratamentos de criopreservação sem a etapa de congelamento em nitrogênio líquido, segmentos radiculares foram tratados como descrito anteriormente, porém, após o tratamento com solução de vitrificação, foram diretamente lavados e incubados em 1,0 mL de meio MS acrescido de 1,2 M de sacarose, por 30 minutos. Em seguida, foram inoculados em meio de recultivo.

As frequências de recuperação foram determinadas, ao longo de seis semanas de cultivo, pela porcentagem de segmentos que demonstraram formação de raízes laterais após inoculação em meio de recultivo. Ao final de seis semanas, as culturas obtidas a partir de segmentos submetidos à criopreservação, foram subcultivadas para meio fresco de igual composição, sendo utilizados 5 segmentos radiculares para dar início às novas culturas. A cada subcultura foram realizadas análises relativas aos pesos de matéria fresca (PF) e seca (PS). As avaliações foram realizadas em cinco replicatas por tratamento e os experimentos foram repetidos três vezes.

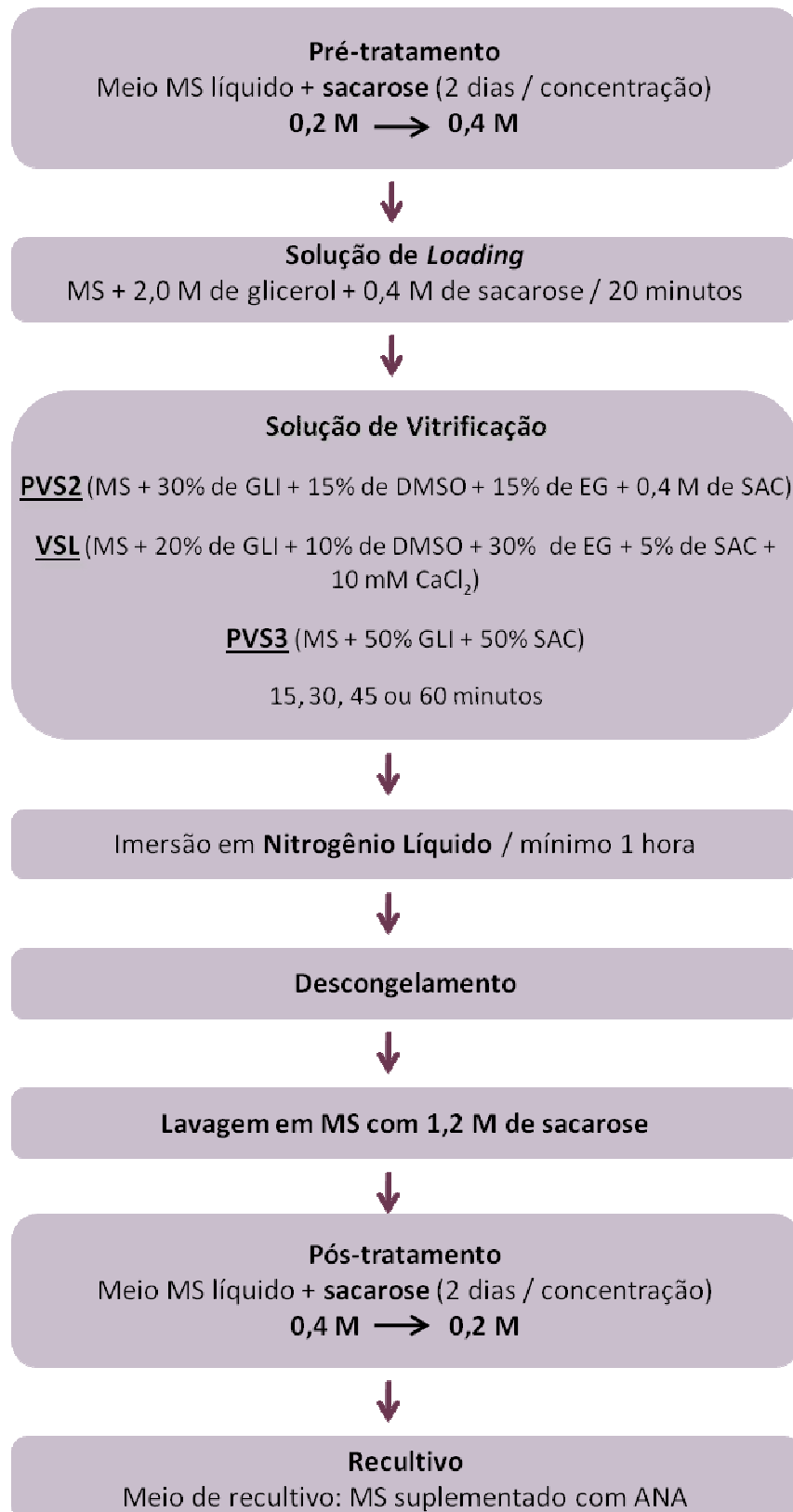


Figura 3 - Estabelecimento de protocolos de criopreservação, pelo método de vitrificação, para segmentos radiculares produzidos *in vitro* de *C. rosea*.

c) Regeneração de brotos a partir das raízes criopreservadas

Foi avaliada ainda a capacidade de regeneração de brotos a partir das raízes formadas em culturas com 6 semanas, iniciadas após a criopreservação. Para essa avaliação, segmentos radiculares (1 cm) foram inoculados em meio MS solidificado com 8 g.L⁻¹ de agar, acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose e suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ do fitorregulador BAP (Simões *et al.*, 2009a). Foram inoculados 4 segmentos por frasco de cultura (6,5 cm x 8,3 cm) vedado com tampa de polipropileno e contendo 30 mL de meio. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento a 26 ± 2°C, com intensidade luminosa de 45 μmol.m⁻².s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas, sob fotoperíodo de 16 horas. As frequências de regeneração (porcentagem de segmentos radiculares que apresentaram formação de brotos) foram avaliadas 30 dias após o início das culturas. As avaliações foram realizadas em quatro replicatas e os experimentos foram repetidos duas vezes.

2.2.2 Técnica de RAPD

Material vegetal

A avaliação da estabilidade genética foi realizada com três culturas de raízes (C1, C2 e C3), com seis semanas de cultivo, estabelecidas a partir de explantes radiculares após a criopreservação dos mesmos pelo seguinte protocolo: pré- e pós-tratamento na ausência de luminosidade e suplementação com 0,25 mg.L⁻¹ do fitorregulador ANA, seguida de exposição à solução de *Loading* por 20 minutos e solução PVS2 por 15 minutos. Para o controle do padrão de amplificação foram utilizadas três plantas (P1, P2 e P3) propagadas *in vitro* (SIMÕES *et al.*, 2009b), com 45 dias de cultivo, a partir das quais foram retirados os explantes radiculares para a criopreservação.

Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído das culturas de raízes estabelecidas após criopreservação e das folhas das plantas mantidas *in vitro*, segundo o método CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987), com algumas modificações. A concentração de DNA obtido nas extrações foi determinada por comparação visual, utilizando DNA λ como padrão, após eletroforese em gel de agarose a 1,0 %, preparado em tampão TBE. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 mg.mL⁻¹) e a visualização realizada sob luz ultravioleta. Após

quantificação, alíquotas (100 µL) de DNA foram armazenadas em tubos Eppendorf a -20 °C, para análise posterior.

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Para a análise RAPD, foram testados inicialmente sessenta diferentes oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) (Tabela 5), compostos de 10 bases de sequências arbitrárias, visando à seleção quanto ao número de fragmentos produzidos.

As reações RAPD foram realizadas em um termociclador PTC-100 MJ (MJ Research, Inc.), em um volume final de 25 µL contendo: 20 ng de DNA genômico; tampão PCR 1X; 3 mM de MgCl₂; 0,25 µM de cada *primer*; 0,20 mM de dNTP (mix); 1,5U de Taq DNA polimerase e água Milli-Q para completar o volume final.

O programa de amplificação, utilizado previamente no Núcleo de Biotecnologia da UERJ para estudos com outras espécies vegetais, consistiu de uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 44 ciclos constituídos de: desnaturação a 94°C por 1 min., etapa de anelamento a 35°C por 2 min., extensão a 72°C por 2 min. e finalização com 1 ciclo a 72°C por 5 minutos.

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,4% preparado com tampão TBE, corado com brometo de etídio e fotografado com sistema de captura de imagens L-PIX-ST Loccus Biotecnologia. Foi realizada avaliação quanto à presença ou ausência de fragmentos amplificados nas amostras obtidas de culturas de raízes criopreservadas, em comparação com suas respectivas plantas de origem. Todas as amplificações foram repetidas duas vezes e somente as bandas reprodutíveis foram consideradas para análise.

3 RESULTADOS

3.1 Culturas de raízes

Os experimentos de multiplicação de raízes *in vitro* foram realizados com segmentos radiculares que apresentavam estrutura anatômica distinta, como reportado por Simões *et al.* (2009b). Os segmentos medianos eram formados por tecidos primários (Figura 2a), enquanto que os proximais eram constituídos por uma estrutura secundária bem definida (Figura 2b).

Os segmentos radiculares medianos e proximais inoculados em meio de cultura sem suplementação hormonal apresentaram, durante a primeira semana de cultivo, início de formação de raízes laterais, diretamente a partir dos explantes. Nas semanas seguintes, as culturas apresentaram discreta multiplicação de raízes. Apesar da baixa produção demonstrada pelos pesos de matéria fresca e seca (Tabela 1), as raízes apresentaram alongamento (Figura 4a). Esse padrão foi observado ao longo das subculturas, o que sugere a necessidade de suplementação com fitorreguladores visando ao aumento da produção de biomassa.

As culturas de raízes estabelecidas em meio suplementado com AIA apresentaram, na primeira semana de cultivo, intumescimento em algumas regiões dos explantes com posterior surgimento de protuberâncias. Essas protuberâncias se desenvolveram em raízes laterais, muito finas e em número reduzido, de forma direta, sem formação de calos (Figura 4b). Durante a segunda semana surgiram brotos em um terço das culturas iniciadas a partir de segmentos proximais ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) e medianos ($0,25$ e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) (Figura 4c). Ao longo da quarta semana a proliferação de brotos também foi observada nas culturas mantidas nas demais concentrações do fitorregulador e na mesma intensidade verificada anteriormente. Segmentos medianos e proximais apresentaram maior multiplicação de raízes ao final de seis semanas de cultivo em meio suplementado com AIA, quando este fitorregulador foi utilizado na concentração de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (Tabela 1).

Ao longo das sucessivas subculturas observou-se um atraso no início da resposta morfogênica. Essas raízes apresentavam-se mais finas, em todas as concentrações do fitorregulador e independentemente da região de origem dos segmentos. Após a segunda subcultura, os segmentos passaram a produzir uma substância de coloração amarela em meios suplementados com $0,25$ e $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA (Figura 4d), a partir da quarta semana de cultivo. Esta coloração se intensificou nas sucessivas subculturas e passou a ser observada no

próprio meio de cultivo, em todas as concentrações do fitorregulador. A produção de raízes e brotos manteve-se na mesma proporção ao longo das subculturas.

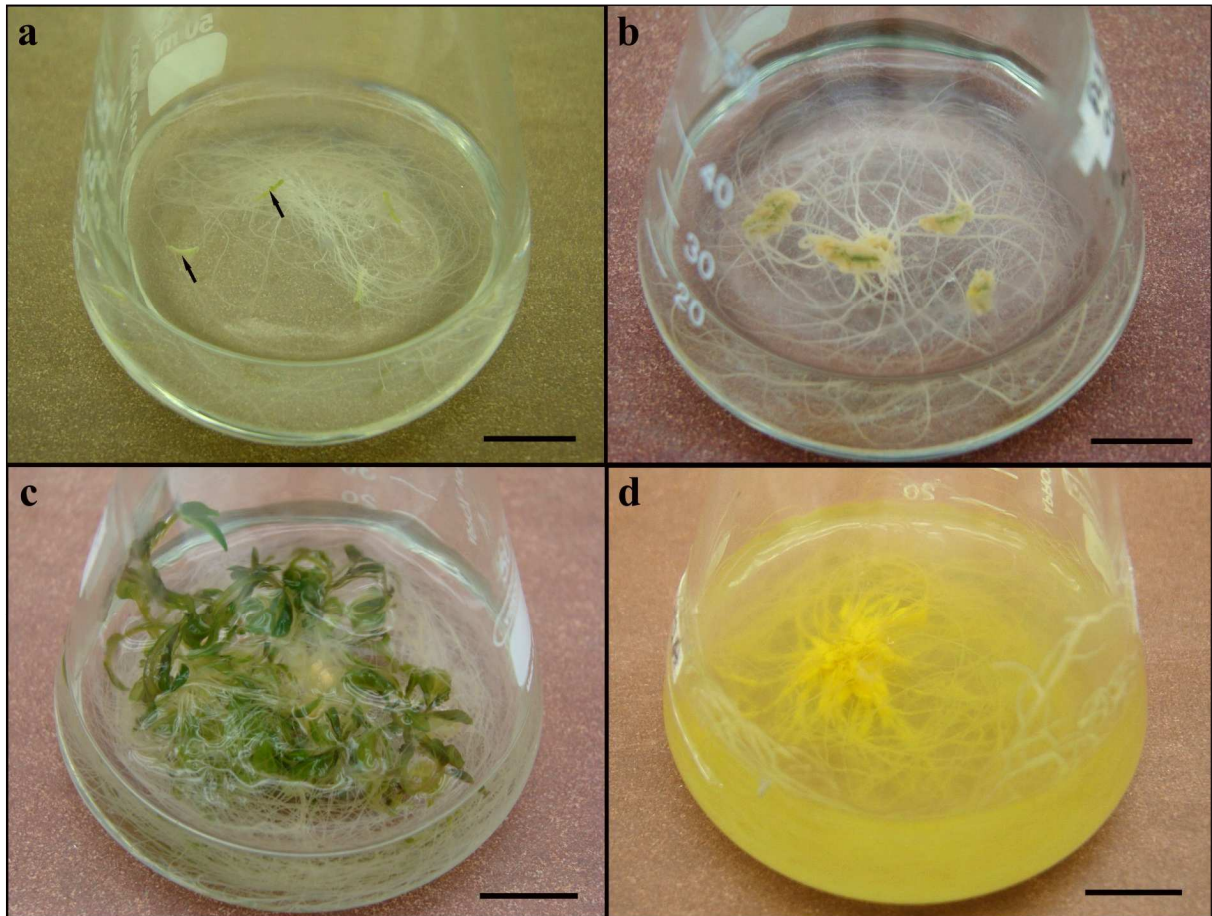


Figura 4 - Resposta morfogênica de raízes de *C. rosea* cultivadas *in vitro* em meio MS, com seis semanas de cultivo: a) segmentos proximais (setas) em meio sem suplementação de fitorregulador; b) segmentos proximais em meio com $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA; c) segmentos medianos em meio com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA; d) segmentos medianos em meio com $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA mostrando produção de substância amarela. Barras: 1,00 cm.

Tabela 1 - Efeito dos fitorreguladores ANA, AIB e AIA sobre o crescimento de raízes de *C. rosea* cultivadas *in vitro*, a partir de segmentos proximais e medianos, após 6 semanas em meio de cultura MS.

Fitorregulador	Concentração (mg.L ⁻¹)	Segmentos proximais		Segmentos medianos	
		PF (g)	PS (g)	PF (g)	PS (g)
-	-	0,042 ± 0,030 c	0,007 ± 0,002 c	0,010 ± 0,008 b	0,002 ± 0,001 c
ANA	0,25	1,647 ± 0,365 a	0,183 ± 0,011 a	1,573 ± 0,592 a	0,192 ± 0,011 a
	0,50	1,469 ± 0,378 a	0,180 ± 0,012 a	1,493 ± 0,378 a	0,184 ± 0,008 a
	1,00	1,597 ± 0,629 a	0,162 ± 0,030 a	1,531 ± 0,627 a	0,142 ± 0,039 ab
	0,25	0,752 ± 0,205 b	0,097 ± 0,046 b	0,705 ± 0,217 b	0,050 ± 0,014 bc
AIB	0,50	0,801 ± 0,517 ab	0,115 ± 0,050 b	0,895 ± 0,426 ab	0,194 ± 0,093 a
	1,00	0,961 ± 0,686 a	0,173 ± 0,018 a	0,837 ± 0,465 b	0,093 ± 0,054 b
	0,25	0,148 ± 0,129 c	0,023 ± 0,0140 c	0,230 ± 0,161 b	0,018 ± 0,010 c
AIA	0,50	0,144 ± 0,106 c	0,020 ± 0,013 c	0,070 ± 0,039 b	0,010 ± 0,005 c
	1,00	0,153 ± 0,120 c	0,034 ± 0,022 c	0,317 ± 0,387 b	0,029 ± 0,032 bc

Dados representam média ± desvio padrão.

Pesos iniciais (g) dos segmentos: proximais (PF= 0,0014; PS= 0,0006) e medianos (PF= 0,0008; PS= 0,0001).

Valores seguidos pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

A suplementação com o fitorregulador AIB resultou na formação de raízes, por organogênese direta, logo na primeira semana de cultivo, sem apresentar intumescimento, com exceção dos segmentos proximais inoculados em meio suplementado com 1,0 mg.L⁻¹. As raízes laterais se alongaram durante as semanas seguintes, porém sem demonstrar considerável aumento em termos numéricos. A partir da terceira semana surgiram brotos nas extremidades dos segmentos cultivados em meio suplementado com 0,25 (Figura 5a) e 0,50 mg.L⁻¹ de AIB, embora não tenham se desenvolvido ou apresentado multiplicação. Considerável crescimento das raízes foi observado em meio com 1,0 mg.L⁻¹ desse fitorregulador (Tabela 1), independentemente do tipo de segmento utilizado para dar início às culturas (Figuras 5b e 5c).

Em meio suplementado com AIB, o crescimento das raízes apresentou-se de forma variável ao longo das subculturas (Figura 6), além de estas tornarem-se cada vez mais finas e frágeis. Por volta da quinta semana de cultivo após a segunda subcultura, as raízes produzidas em meios com 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹ de AIB começaram a apresentar produção da substância de

coloração amarela observada anteriormente nas culturas mantidas em meio com AIA. A produção da substância se concentrava nas proximidades dos segmentos inoculados (Figura 5d). Em meio suplementado com $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ essa coloração surgiu após a terceira subcultura.

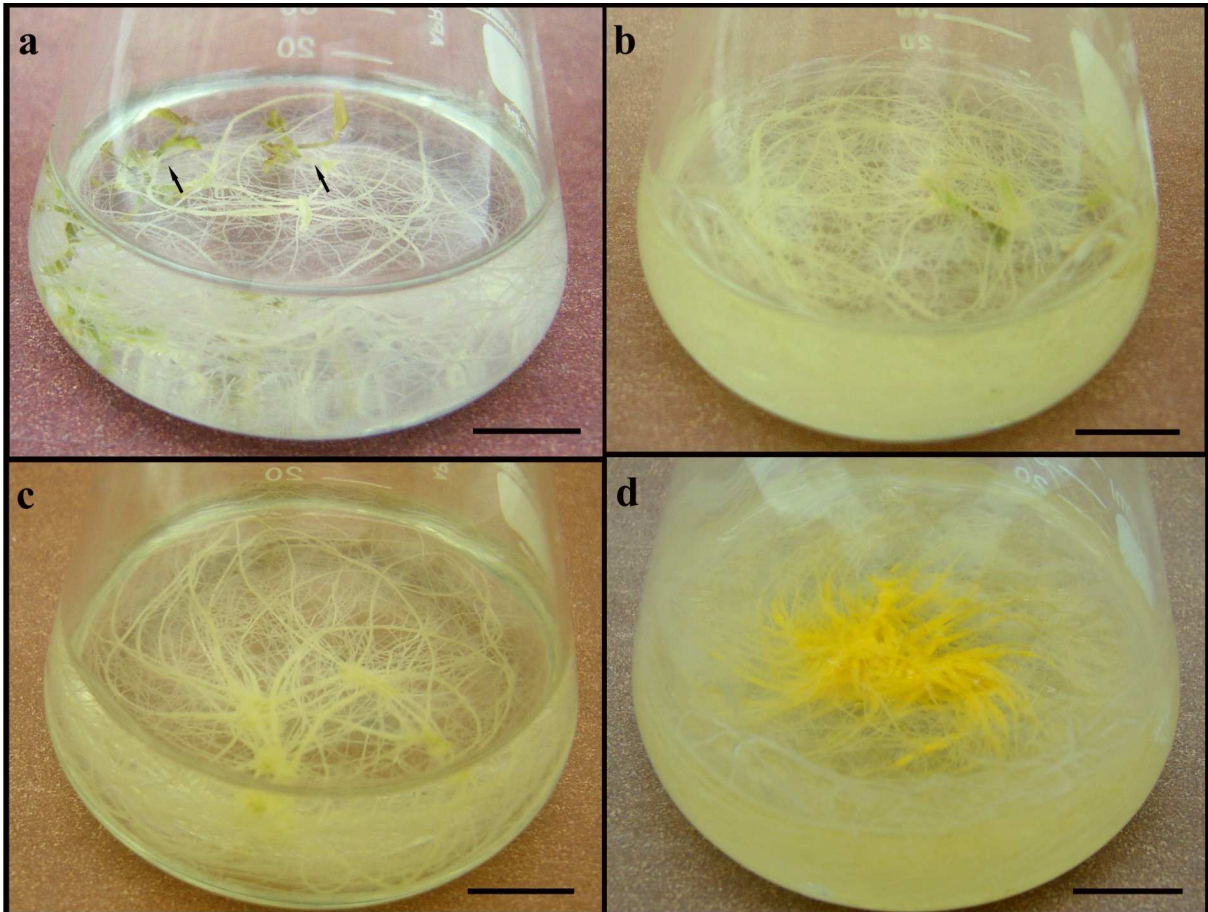


Figura 5 - Raízes de *C. rosea* cultivadas *in vitro* em meio MS suplementado com AIB, com seis semanas de cultivo: a) segmentos proximais apresentando brotos (setas) em meio com $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$; b) segmentos proximais em meio com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$; c) segmentos medianos em meio com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$; d) segmentos medianos em meio com $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB mostrando produção de substância amarela. Barras: 1,00 cm.

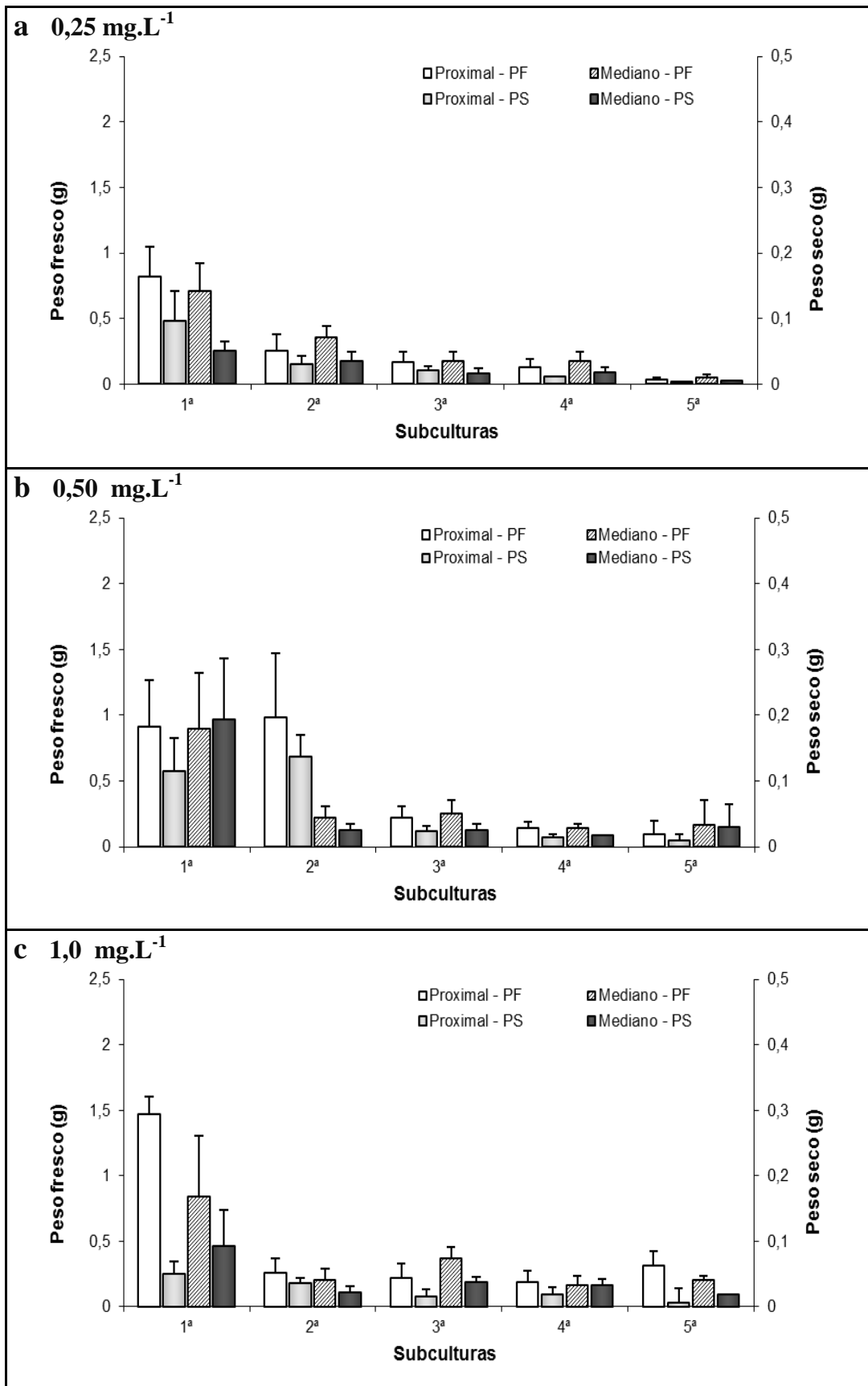


Figura 6 - Acúmulo de biomassa em culturas de raízes de *C. rosea* estabelecidas a partir de segmentos radiculares proximais e medianos, ao longo das subculturas, em meio MS contendo AIB nas concentrações de 0,25 mg.L⁻¹ (a), 0,50 mg.L⁻¹ (b) e 1,0 mg.L⁻¹ (c). Dados representam média \pm desvio padrão.

O espectro de absorção das amostras de culturas de raízes estabelecidas em meios suplementados com AIA e AIB apresentaram um perfil característico da maior parte dos carotenóides, sendo constituído de picos de absorção na faixa de 400 nm (453 nm e 478 nm) (Figura 7).

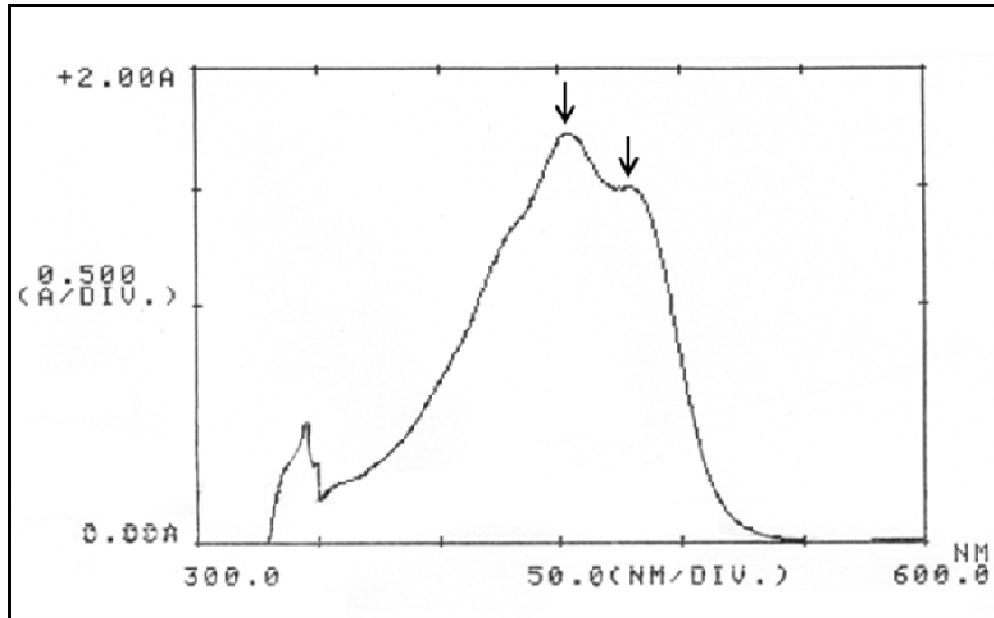


Figura 7 - Espectro de absorção da amostra obtida de cultura de raízes estabelecidas em meio suplementado com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB: varredura de 300 a 600 nm. Setas: picos de absorbância máxima (453 nm e 478 nm).

Quando o meio de cultura foi suplementado com o fitorregulador ANA observou-se, ao final da primeira semana após o início das culturas, intumescimento e surgimento de protuberâncias na superfície de todos os segmentos. Durante a segunda semana, as protuberâncias se desenvolveram em raízes laterais por organogênese direta; embora esta resposta tenha sido observada nas culturas mantidas em meio com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ apenas na semana seguinte (Figura 8). A multiplicação de raízes ocorreu de forma expressiva nas concentrações $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 10a) e $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA, enquanto que em meios suplementados com a maior concentração ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$), as raízes apresentaram espessura mais fina e aspecto frágil (Figura 10b). Com base nos valores de PF e PS foi possível observar considerável crescimento ao final de 6 semanas, independentemente da concentração de ANA utilizada nas culturas (Tabela 1). Os segmentos inoculados apresentaram expressiva proliferação de células ao longo das semanas de cultivo, caracterizando um aspecto de calogênese, que era diretamente proporcional à concentração de fitorregulador utilizada no meio de cultura.

Ao longo de sucessivas subculturas, as raízes cultivadas em meio suplementado com ANA mantiveram o mesmo padrão de resposta morfológica. Após a quarta subcultura, o crescimento das raízes demonstrou considerável redução (Figuras 9a, 9b e 9c). Além disso, os segmentos inoculados em meio suplementado com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ deste fitorregulador apresentaram maior caelejamento e menor produção de raízes em relação às culturas anteriores.

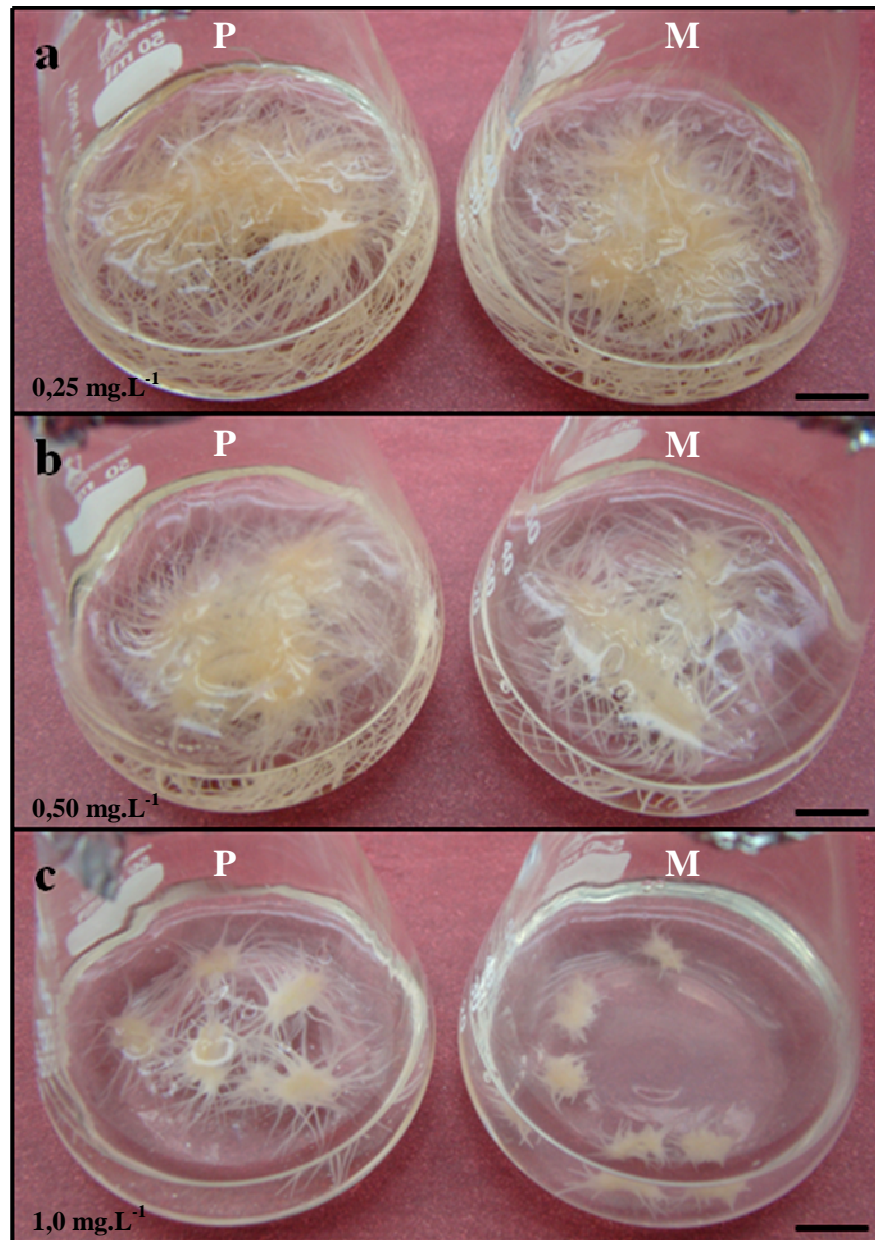


Figura 8 – Multiplicação de raízes *in vitro* de *C. rosea* a partir de segmentos proximais (P) e segmentos medianos (M), durante a terceira semana de cultivo em meio MS suplementado com ANA nas concentrações de $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ (a), $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ (b) e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (c). Barras: 0,90 cm.

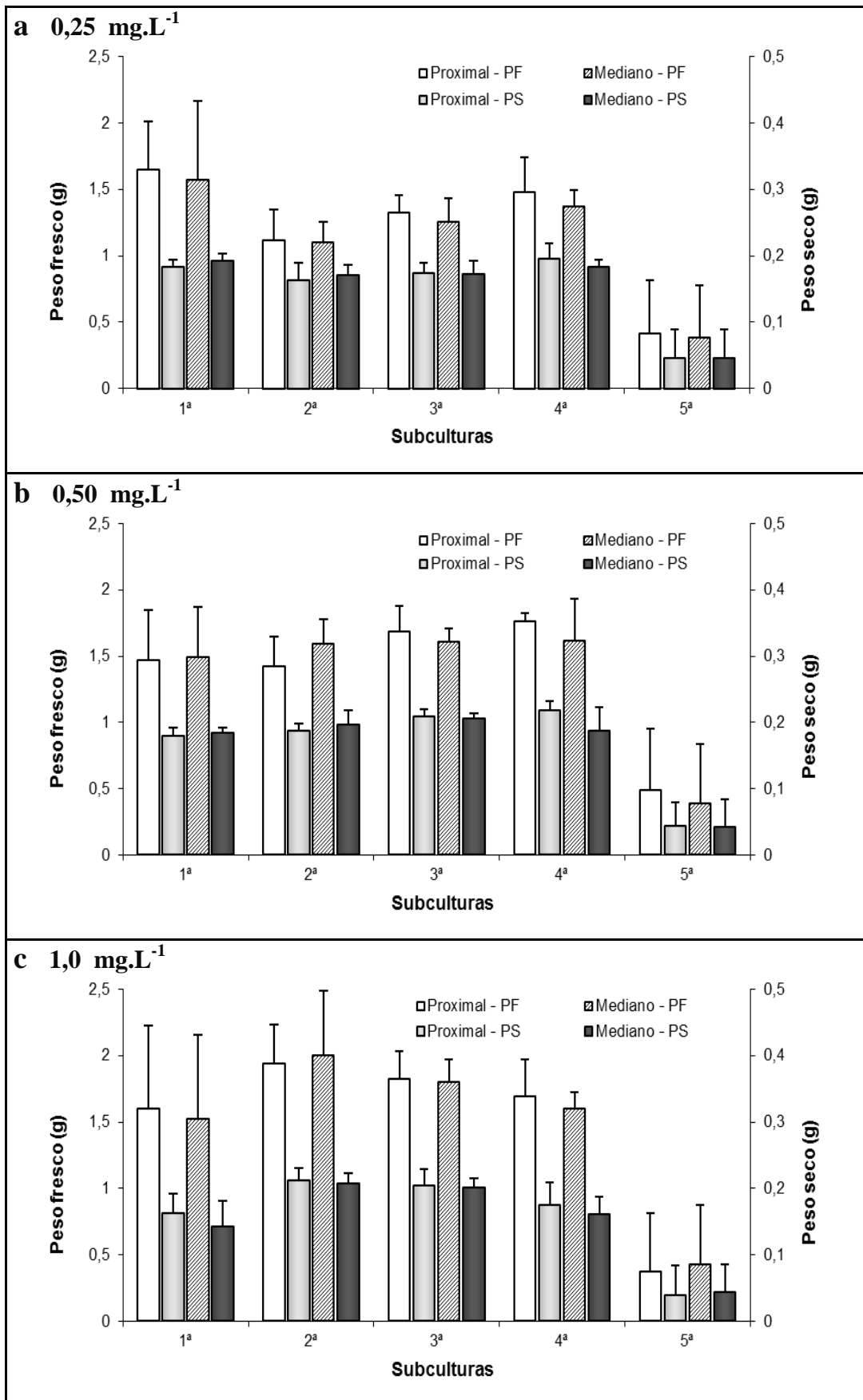


Figura 9 - Acúmulo de biomassa em culturas de raízes de *C. rosea* estabelecidas a partir de segmentos radiculares proximais e medianos, ao longo das subculturas, em meio MS contendo ANA nas concentrações de 0,25 mg.L⁻¹ (a), 0,5 mg.L⁻¹ (b) e 1,0 mg.L⁻¹ (c). Dados representam média ± desvio padrão.

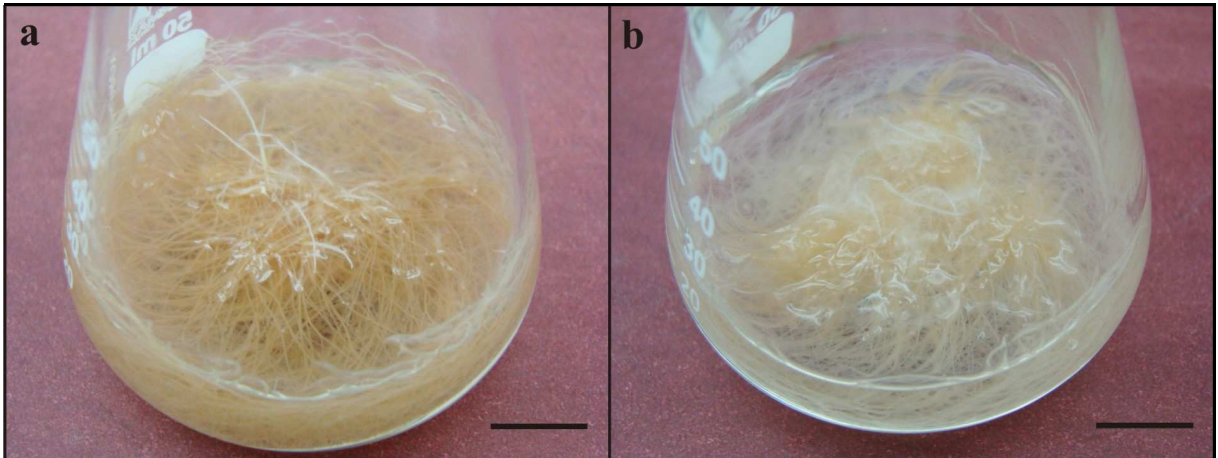


Figura 10 – Multiplicação de raízes *in vitro* de *C. rosea* com seis semanas de cultivo em meio MS suplementado com ANA nas concentrações de $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ (a) e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (b). Barras: 1,0 cm.

Quando o fitorregulador 2,4-D foi utilizado para suplementar o meio de cultura, não ocorreu a formação de raízes. Os segmentos proximais e medianos, inoculados em todas as concentrações testadas, apresentaram intumescimento com subsequente desenvolvimento de calos, a partir dos quais se destacavam células que se mantinham em suspensão no meio de cultura (Figura 11).

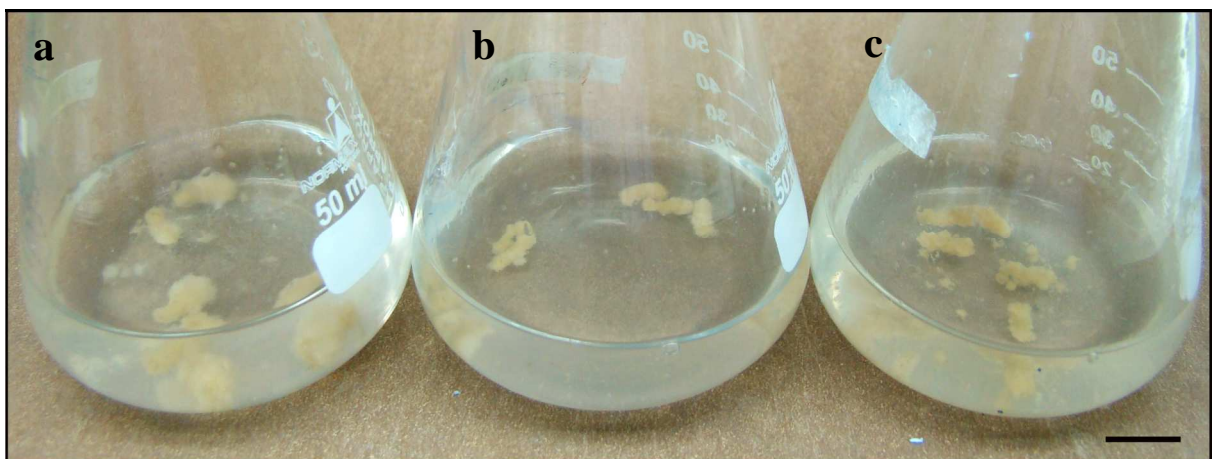


Figura 11 – Calogênese a partir de segmentos radiculares de *C. rosea* cultivados *in vitro* em meio MS suplementado com 2,4-D, com seis semanas de cultivo: a) $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$; b) $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e c) $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Barra: 0,94 cm.

Segmentos radiculares inoculados em meios suplementados com a citocinina KIN, independentemente da concentração utilizada, apresentaram a formação de brotos. O surgimento de gemas foi observado a partir da primeira semana de cultivo em segmentos proximais, enquanto que nos medianos esta resposta ocorreu durante a segunda semana (Figura 12a). Ainda durante a segunda semana, as gemas produzidas em segmentos proximais

se desenvolveram em brotos (Figura 12b) e algumas poucas raízes laterais se formaram em todos os segmentos, apresentando aspecto fino e frágil. A partir da terceira semana foi possível observar a proliferação e o crescimento dos brotos a partir dos segmentos medianos (Figura 12c), em todas as concentrações do fitorregulador. Esta resposta também ocorreu em relação aos segmentos proximais, porém em maior quantidade (Figuras 12d). Ao final de seis semanas, as raízes formadas não puderam ser subcultivadas devido à grande quantidade de brotos.

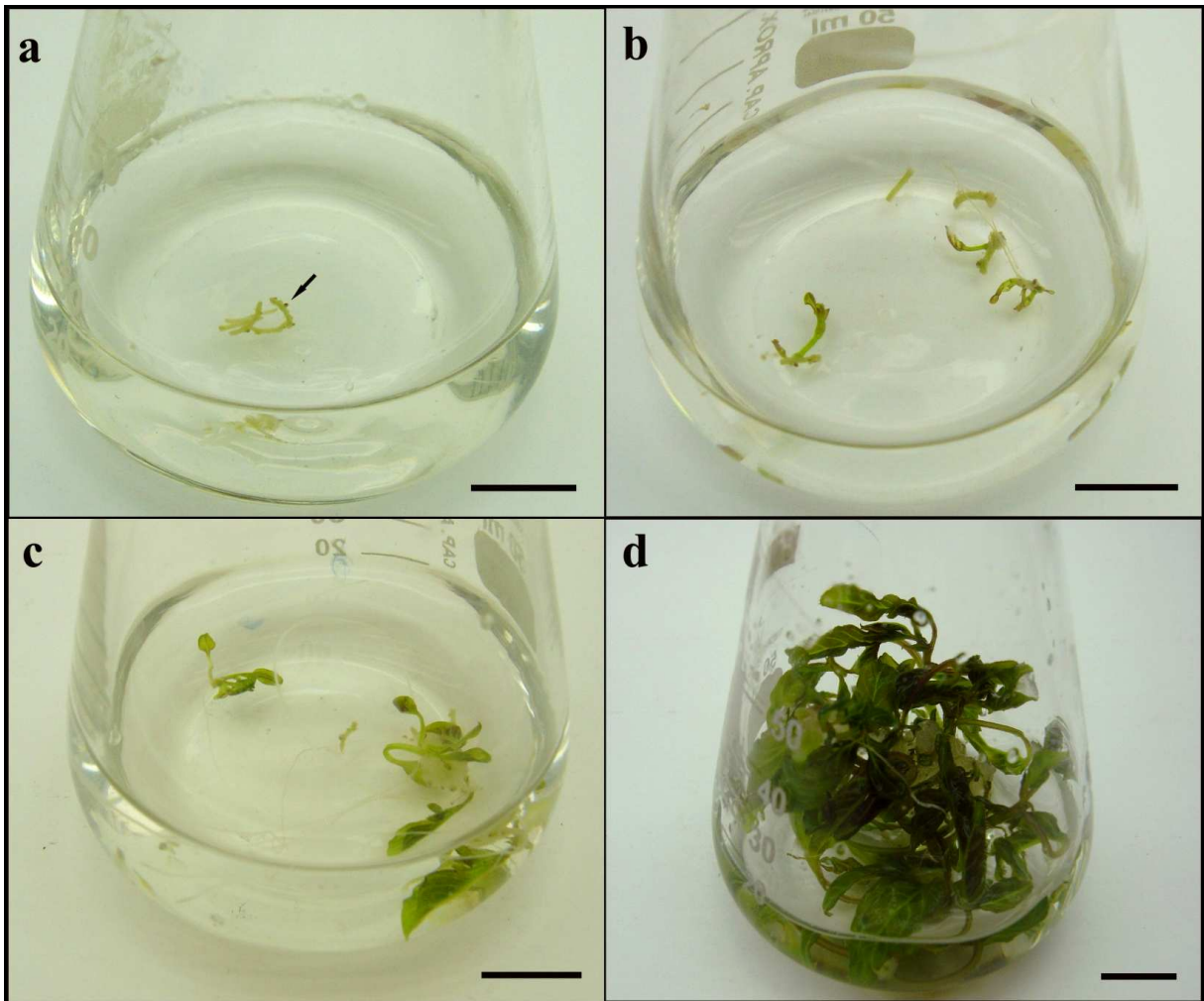


Figura 12 - Resposta morfogênica de raízes de *C. rosea* cultivadas *in vitro* em meio MS suplementado com KIN: a) segmentos medianos apresentando gemas (seta), após 2 semanas de cultivo; b) segmentos proximais com 2 semanas de cultivo; c) segmentos medianos com 4 semanas de cultivo; d) segmentos proximais com 4 semanas de cultivo. Barras: 1,00 cm.

3.2 Criopreservação

3.2.1 Avaliação de protocolos pelo método de vitrificação

A viabilidade dos segmentos radiculares, submetidos aos diferentes tratamentos de vitrificação, foi alterada tanto quando houve somente tratamento de crioproteção, quanto depois do congelamento. De um modo geral, segmentos radiculares submetidos aos tratamentos de vitrificação apresentaram retardo no início da resposta de multiplicação, que ocorreu no início da terceira semana de cultivo, quando comparado ao tempo de resposta de culturas de raízes sem esse tratamento. As culturas foram acompanhadas ao longo de seis semanas, quando foram finalizadas as análises para cálculo das frequências de recuperação, ou seja, porcentagem de segmentos que demonstraram formação de raízes laterais após inoculação em meio de recultivo. A resposta morfogênica nos segmentos apresentou-se como intumescimento dos segmentos, seguido pelo desenvolvimento de raízes laterais por organogênese direta (Figura 13a).

De forma geral, os segmentos que não apresentaram resposta após os tratamentos de crioproteção e após a criopreservação mantiveram-se, durante as seis semanas de avaliação, com o mesmo aspecto que apresentavam quando foram inoculados no meio de recultivo. Alguns segmentos apresentaram aspecto intumescido após a criopreservação, porém não desenvolveram raízes laterais posteriormente, sendo também desconsiderados para o cálculo das frequências de recuperação. Além disso, alguns segmentos apresentaram-se partidos em fragmentos de 0,2-0,3 mm após a criopreservação; nesse caso, aqueles que apresentaram formação de raízes foram considerados para cálculo das frequências de recuperação.

Para avaliar os efeitos de diferentes soluções de vitrificação, os segmentos radiculares foram tratados com PVS2, PVS3 e VSL por diferentes períodos de exposição. Os protocolos nos quais foram utilizadas as soluções PVS3 e VSL, com pré-tratamento e pós-tratamento em presença de luminosidade e sem suplementação hormonal, não foram eficientes para a sobrevivência dos segmentos após a criopreservação, embora esses tratamentos tenham resultado em frequências de recuperação de 100% para aqueles segmentos que não foram imersos em nitrogênio líquido. Em contrapartida, quando criopreservados em solução PVS2, os segmentos apresentaram frequências de recuperação que variaram entre 0 e 31,1% (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito do pré-tratamento e pós-tratamento na recuperação de raízes de *C. rosea* tratadas com soluções de *Loading* e PVS2, após seis semanas de inoculação em meio de recultivo.

Pré-tratamento	Vitrificação		Condições de recuperação		Frequência de recuperação (%)		
	<i>Loading</i>	PVS2	Pós-tratamento	Meio de recultivo	- NL	+ NL	
ANA (mg.L ⁻¹) Luminosidade	Tempo de exposição (min)		ANA (mg.L ⁻¹) Luminosidade	ANA (mg.L ⁻¹)			
-	Claro	20	30	-		96,7 ± 8,2	13,3 ± 11,5 b
		45	45	Claro	1,0	81,3 ± 11,9	0 b
		60	60			84,7 ± 8,7	31,1 ± 10,2 ab
1,0	Claro	20	30	1,0		100,0 ± 0,0	20,0 ± 0,0 b
		45	45	Claro	1,0	40,0 ± 0,0	50,0 ± 10,0 a
		60	60			40,0 ± 0,0	33,3 ± 11,5 ab
0,25	Claro	20	30	0,25		85,0 ± 10,0	42,5 ± 12,6 ab
		45	45	Claro	0,25	80,8 ± 1,7	45,0 ± 10,0 ab
		60	60			80,0 ± 0,0	45,6 ± 17,4 a
-	Escuro	20	30	-		66,7 ± 9,0	0 b
		45	45	Escuro	0,25	87,5 ± 10,5	0 b
		60	60			88,9 ± 9,7	0 b

Dados representam média ± desvio padrão.

Frequência de recuperação = porcentagem de segmentos com formação de raízes.

-NL= sem imersão em nitrogênio líquido; +NL= com imersão em nitrogênio líquido.

Valores seguidos pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

A suplementação dos meios de pré-tratamento e pós-tratamento com 1,0 mg.L⁻¹ do regulador de crescimento ANA, resultou em aumento nas frequências de recuperação após criopreservação com solução PVS2, atingindo valores de até 50% (Tabela 2).

Tendo em vista os resultados obtidos nos experimentos com culturas de raízes, foi utilizada a concentração de 0,25 mg.L⁻¹ do fitorregulador ANA, nas etapas de pré-tratamento, pós-tratamento e no meio de recultivo. Sendo assim, quando os experimentos foram realizados em presença de luminosidade, os segmentos apresentaram frequências de recuperação que não variaram significativamente em função do tempo de exposição à solução PVS2, com valores entre 42,5 e 45,6% (Tabela 2).

Quando o pré-tratamento e o pós-tratamento foram realizados na ausência de luminosidade e sem suplementação hormonal, nenhum explante apresentou capacidade de recuperação após congelamento (Tabela 2).

A ausência de luminosidade também foi testada em associação com a suplementação com $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA, nas etapas de pré-tratamento e pós-tratamento, resultando em frequências de recuperação de 27,5 a 76,8% (Tabela 3).

Para avaliar a necessidade de utilização da solução de *Loading*, o mesmo protocolo descrito anteriormente foi realizado sem expor os explantes a essa solução intermediária. Como resultado, foi possível observar frequências de recuperação que não diferiram significativamente daquelas obtidas quando os explantes foram expostos à solução de *Loading* (Tabela 3). No entanto, nos segmentos que não foram tratados com essa solução, a formação de raízes laterais se iniciou ao final da terceira semana.

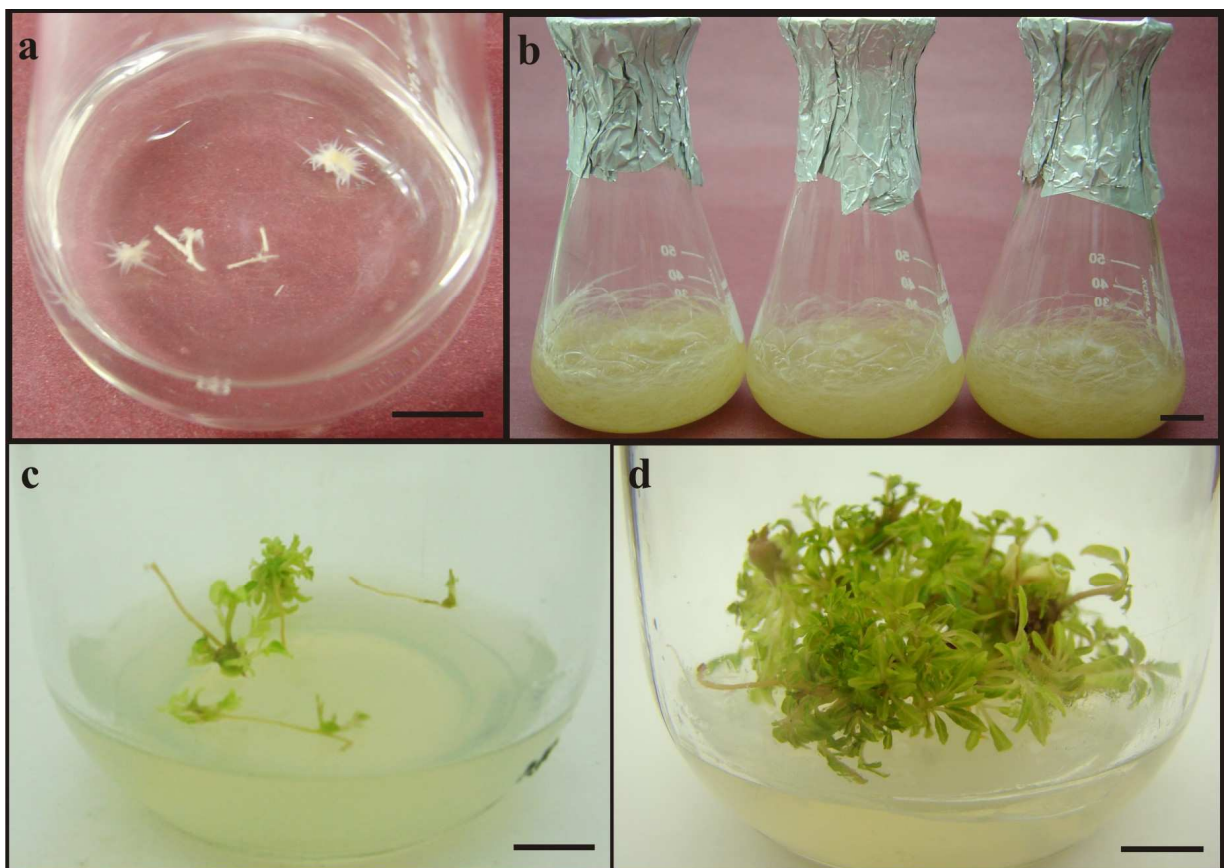


Figura 13 - Resposta morfogênica de raízes de *C. rosea* após a criopreservação com pré-tratamento e pós-tratamento na ausência de luminosidade e com suplementação com $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ do fitorregulador ANA, seguida de exposição às soluções de *Loading* e PVS2: a) segmentos radiculares em meio de recultivo, durante terceira semana; b) culturas estabelecidas a partir de segmentos expostos por 15, 30 e 45 minutos à solução PVS2, respectivamente, com 6 semanas; c) regeneração de brotos a partir de segmentos que foram criopreservados, com 3 semanas; d) regeneração de brotos após 8 semanas de cultivo. Barras: 1,0 cm.

Tabela 3 - Efeito de diferentes soluções de vitrificação na recuperação de raízes de *C. rosea*, após seis semanas de inoculação em meio de recultivo.

Pré-tratamento		Vitrificação		Recuperação		Frequência de recuperação (%)	
ANA (mg.L ⁻¹)	Loadiing (min)	Solução de vitrificação	Tempo (min)	Pós-tratamento	Meio de recultivo	- NL	+ NL
0,25 Escuro	20	PVS2	15	0,25 Escuro	0,25	100,0 ± 0,0	76,8 ± 12,1 ab
		PVS2	30			100,0 ± 0,0	63,6 ± 19,0 b
		PVS2	45			100,0 ± 0,0	42,9 ± 7,0 c
		PVS2	60			100,0 ± 0,0	27,5 ± 12,9 c
	-	PVS2	15			100,0 ± 0,0	66,7 ± 19,7 b
		PVS2	30			100,0 ± 0,0	62,7 ± 14,0 bc
		PVS2	45			100,0 ± 0,0	55,0 ± 7,1 bc
		PVS2	60			100,0 ± 0,0	30,0 ± 14,1 bc
0,25 Escuro	20	PVS3	15	0,25 Escuro	0,25	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0 a
		PVS3	30			100,0 ± 0,0	90,0 ± 11,0 ab
		PVS3	45			100,0 ± 0,0	85,8 ± 9,6 ab
		PVS3	60			100,0 ± 0,0	45,0 ± 10,0 bc
	-	PVS3	15			100,0 ± 0,0	82,5 ± 12,6 ab
		PVS3	30			100,0 ± 0,0	82,5 ± 17,1 ab
		PVS3	45			100,0 ± 0,0	86,7 ± 16,3 ab
		PVS3	60			100,0 ± 0,0	67,5 ± 27,5 ab
0,25 Escuro	20	VSL	15	0,25 Escuro	0,25	100,0 ± 0,0	0 d
		VSL	30			100,0 ± 0,0	0 d
		VSL	45			100,0 ± 0,0	0 d
		VSL	60			100,0 ± 0,0	0 d

Dados representam média ± desvio padrão.

Frequência de recuperação = porcentagem de segmentos com formação de raízes.

-NL= sem imersão em nitrogênio líquido; +NL= com imersão em nitrogênio líquido.

Valores seguidos pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

Considerando os resultados obtidos nos experimentos com a solução PVS2, nos quais as etapas de pré-tratamento e pós-tratamento foram realizadas na ausência de luminosidade e com suplementação com 0,25 mg.L⁻¹ de ANA, foram testadas essas mesmas condições em associação com as soluções PVS3 e VSL. Os experimentos nos quais foi utilizada a solução PVS3 resultaram em frequências de recuperação entre 45 e 100% (Tabela 3). Quando esse mesmo protocolo foi realizado sem a etapa de exposição à solução de *Loading*, os explantes

apresentaram frequências de recuperação sem diferenças significativas em relação aos valores obtidos com o uso dessa solução (Tabela 3).

A criopreservação, segundo o protocolo descrito anteriormente, quando realizada com a solução VSL não resultou em recuperação dos explantes (Tabela 3).

Os segmentos radiculares submetidos ao protocolo de criopreservação com pré-tratamento e pós-tratamento na ausência de luminosidade e com suplementação com $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ do fitorregulador ANA, seguida de exposição à solução de *Loading* por 20 minutos e solução PVS2 por 15 minutos, foram avaliados quanto à sua capacidade de multiplicação de raízes (Figura 13b) ao longo de sucessivas subculturas, demonstrando crescimento comparável ao das culturas de raízes não criopreservadas (Figura 14).

As raízes formadas nessas culturas apresentaram capacidade de produção de brotos (Figuras 13c e 13d), de forma que elevados valores de frequência de regeneração (entre 60 e 82,5%) foram encontrados ao longo das subculturas (Tabela 4).

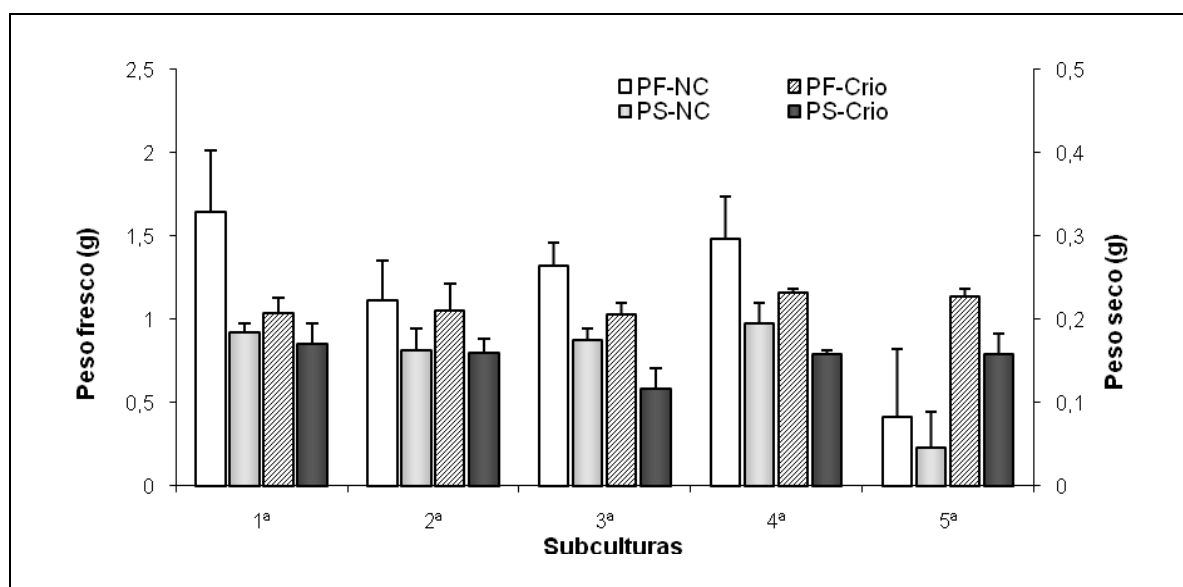


Figura 14 - Avaliação do acúmulo de biomassa de culturas de raízes de *C. rosea* obtidas a partir de segmentos radiculares criopreservados com pré-tratamento e pós-tratamento na ausência de luminosidade e com suplementação com $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ do fitorregulador ANA, seguida de exposição à solução de *Loading* por 20 minutos e solução PVS2 por 15 minutos. PF-NC e PS-NC = peso fresco e seco das culturas de raízes, não criopreservadas. PF-Crio e PS-Crio = peso fresco e seco das culturas após criopreservação, mantidas em meio suplementado com $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA. Dados representam média \pm desvio padrão.

Tabela 4 - Avaliação da produção de brotos de raízes de *C. rosea* obtidas a partir de segmentos radiculares criopreservados com pré-tratamento e pós-tratamento na ausência de luminosidade e com suplementação com $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ do fitorregulador ANA, seguida de exposição à solução de *Loading* por 20 minutos e solução PVS2 por 15 minutos.

Frequência de regeneração (%)				
1ª cultura	2ª cultura	3ª cultura	4ª cultura	5ª cultura
$82,5 \pm 3,53$	$67,5 \pm 3,53$	$65,0 \pm 0,0$	$60,0 \pm 0,0$	$75,0 \pm 0,0$

Dados representam média \pm desvio padrão.

Frequência de regeneração = porcentagem de segmentos radiculares que apresentaram formação de brotos em cada frasco de cultura.

3.2.2 Análise da estabilidade genética das raízes criopreservadas

Sessenta *primers* foram previamente analisados quanto ao número de fragmentos (bandas) reprodutíveis, gerados como produtos de amplificação (Tabela 5).

Tabela 5 - Número de produtos de amplificação obtidos com os 60 *primers* utilizados na triagem inicial.

Primer	Sequência (5' → 3')	Nº de bandas	Primer	Sequência (5' → 3')	Nº de bandas
01	CCGGCCTTAC	5	31	CTCGGGTGGG	7
02	AAAACCGGGC	2	32	AGTAGACGGG	0
03	GTCCCAGAGC	8	33	GCTTGTGAAC	2
04	GAGCTCGTGT	6	34	TGACCGAGAC	1
05	GCGGCTGGAG	9	35	TTCCGCGGGC	1
06	AGTAGACGGG	6	36	GTAGACGAGC	6
07	TACGATGACG	7	37	GTCTTTCAGG	4
08	GCTGCGTGAC	0	38	GCGGTTGAGG	7
09	CGACCAGAGC	8	39	CTTTCGTGCT	4
10	CTGAAGCGGA	8	40	ATCTGGCAGC	4
11	TGCCGAGCTG	6	41	ACTCCACGTC	1
12	GGGTAACGCC	5	42	CACCGCAGTT	0
13	TCTGTGCTGG	2	43	AGCCAGGCTG	4
14	CCACAGCAGT	2	44	GCGGTAAGTC	0
15	GATGACCGCC	8	45	GGGTGCAGTT	2
16	TGGACCGGTG	12	46	CCGGGGTTAA	1
17	GAGGGACCTC	7	47	TTAACCGGGG	1
18	ACCCCGAAG	7	48	GAGCACGGGA	4
19	GATGACCGCC	7	49	GAGCCCGTAG	0
20	TTCCCCCAG	2	50	GCAAGTCACT	1
21	ACCGCGAAGG	0	51	GAGAGCCAAC	3
22	CTTCACCCGA	2	52	CAGAAGCGGA	3
23	CCCGGCATAA	5	53	GTCAGAGTCC	2
24	AGGGGTCTTG	6	54	TTCAGGGCAC	3
25	ACGCCAGGT	5	55	ACGGGCCAGT	6
26	CCACACTACC	8	56	CAGTGCCGGT	1
27	GTGACCGACT	3	57	GTCCGGAGTG	3
28	ACACCGGAAC	5	58	ACCTCGGCAC	1
29	CAGCCTACCA	11	59	ACAGCCCCCA	14
30	GTAGCCGTCT	5	60	TGAGCGGACA	6

De um total de sessenta *primers* utilizados, nove foram selecionados (Tabela 6) para as análises RAPD de raízes de *C. rosea* criopreservadas, por apresentarem considerável número de bandas nítidas e contáveis. Os *primers* selecionados produziram um total de 74 bandas com essas características, com média de 8,2 bandas por *primer*.

As ampliações com os *primers* 01, 38 e 60 produziram um total de 54 bandas, as quais se apresentaram monomórficas (Figura 15; Tabela 6), na totalidade das amostras de DNA das três culturas de raízes criopreservadas (C1, C2 e C3) analisadas nesse estudo.

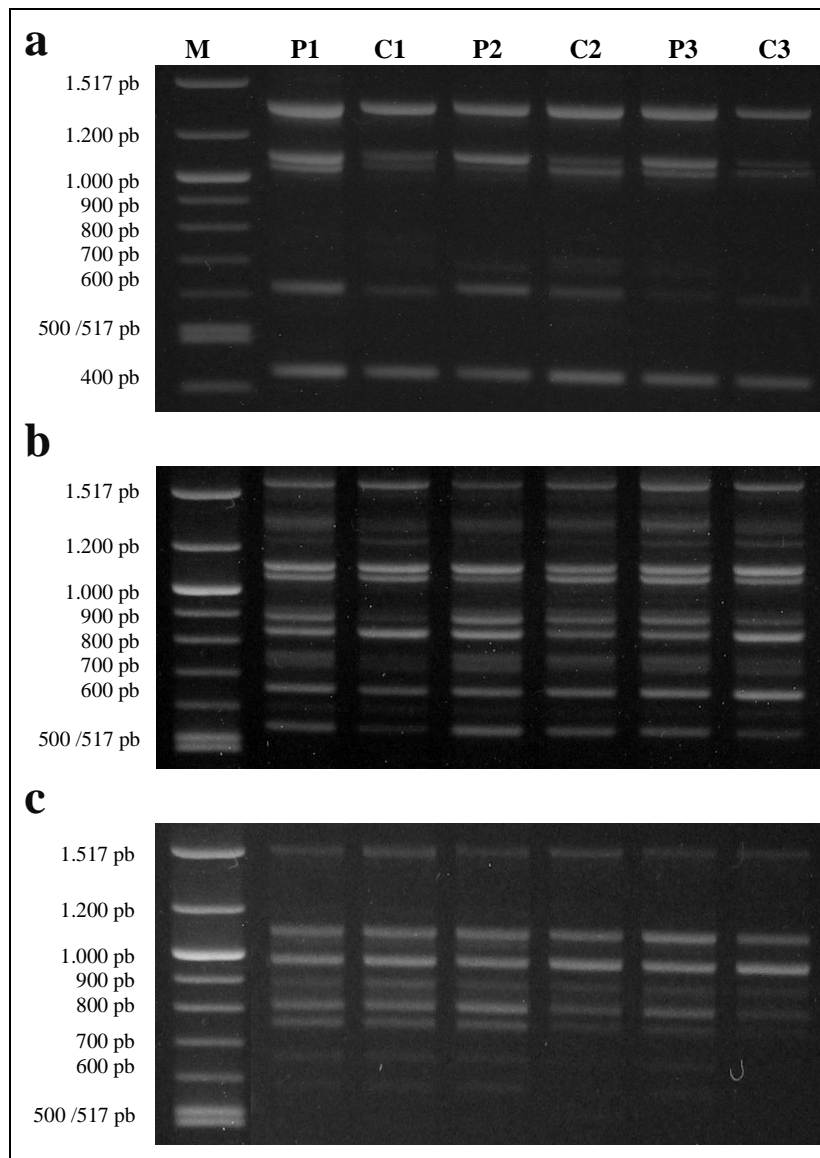


Figura 15 - Padrões de amplificação por RAPD produzidos com os *primers* 01 (a), 38 (b) e 60 (c) em amostras de DNA de plantas micropropagadas de *C. rosea* (P1, P2 e P3) e de culturas de raízes estabelecidas após criopreservação de segmentos radiculares dessas plantas (C1, C2 e C3). M = marcador de peso molecular.

Tabela 6 - Características dos produtos de amplificação detectados com os nove *primers* utilizados nas análises RAPD realizadas com culturas de raízes criopreservadas de *C. rosea*.

Primer	Nº de bandas /primer	Nº total de bandas (nº bandas x nº de culturas analisadas)	Nº total de bandas polimórficas	Polimorfismos (%)
01	5	15	0	0
10	8	24	3	12,5
12	5	15	2	13,3
16	11	33	6	18,2
29	11	33	2	6,1
31	7	21	2	9,5
38	7	21	0	0
59	14	42	7	16,7
60	6	18	0	0
Total	74	222	22	9,9

De um total de 222 bandas analisadas, 200 (90,1%) apresentaram-se monomórficas e 22 polimórficas (9,9%) (Tabela 6), sendo estas observadas nas amplificações com os *primers* 10, 12, 16, 29, 31 e 59. A amostra de DNA obtida da cultura de raízes criopreservadas 3 (C3) apresentou polimorfismos com todos esses *primers* citados anteriormente (Figura 16). Ao passo que, entre as demais amostras (C1 e C2), a cultura de raízes criopreservadas 2 (C2) apresentou somente um polimorfismo na amplificação com o *primer* 12 (Figura 15b).

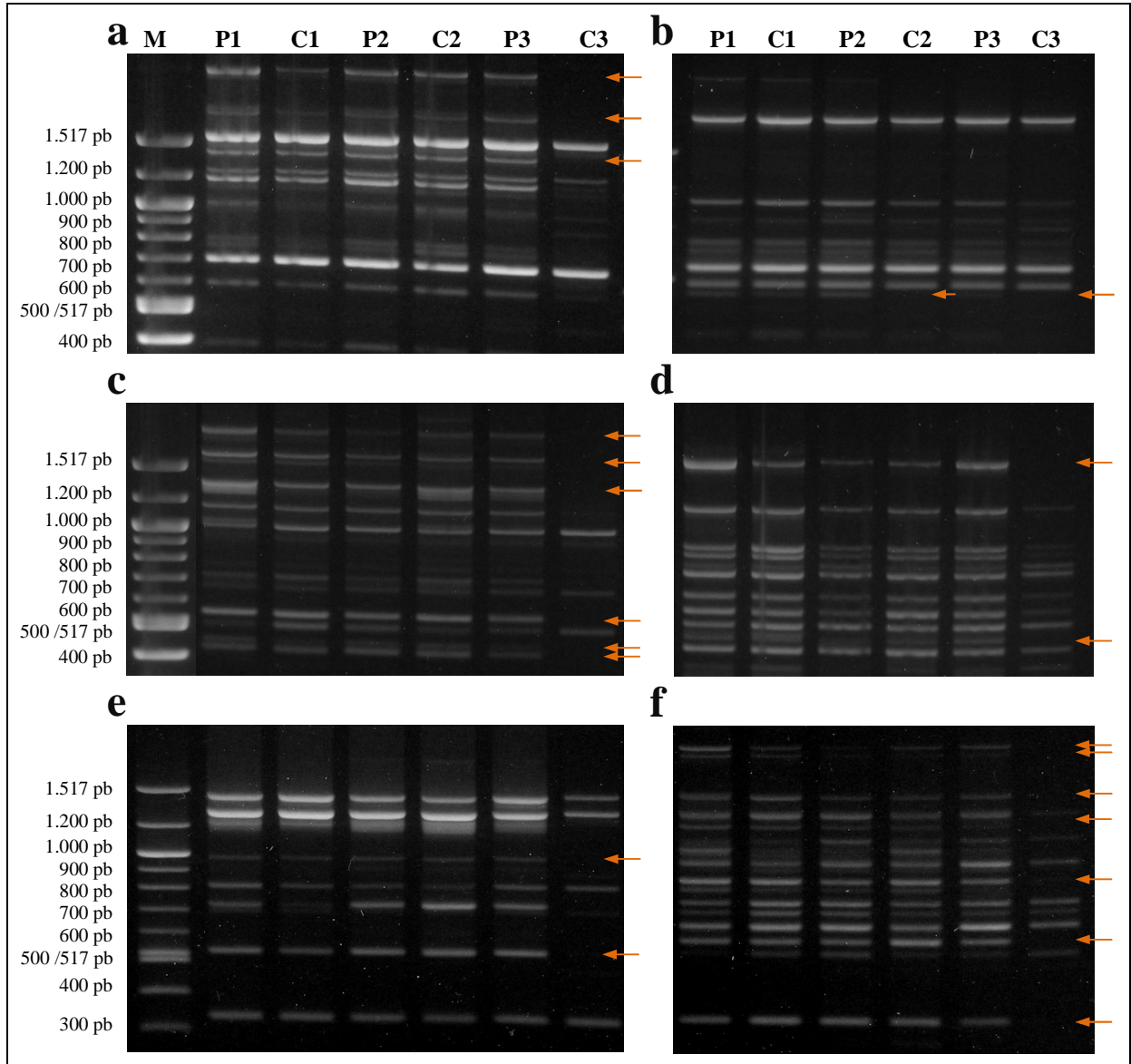


Figura 16 – Padrões de amplificação por RAPD produzidos com os *primers* 10 (a), 12 (b), 16 (c), 29 (d), 31 (e) e 59 (f) em amostras de DNA de plantas micropropagadas de *C. rosea* (P1, P2 e P3) e de culturas de raízes estabelecidas após criopreservação de segmentos radiculares dessas plantas (C1, C2 e C3). M = marcador de peso molecular. Setas indicam os polimorfismos.

4 DISCUSSÃO

A cultura de tecidos vegetais tem sido amplamente utilizada nas últimas décadas, garantindo a propagação e uso de muitas espécies que não seriam passíveis de exploração em seu ambiente natural. Muitas técnicas têm viabilizado não só a produção vegetal, mas a síntese de substâncias de interesse e, nesse sentido, as culturas de raízes representam uma forma eficiente para produção de biomassa, devido ao rápido crescimento e produção estável de metabólitos. (ARORA *et al.*, 2009; CHOI *et al.*, 2000). Além disso, alguns trabalhos descrevem o potencial das raízes como fonte de explantes para a propagação em massa de diferentes espécies. (GOEL; KUKREJA; BISHT, 2009; SIMÕES *et al.*, 2009b; VINO CUR *et al.*, 2000; ZOBAYED; SAXENA, 2003).

Na maioria das vezes, a produção de raízes requer o uso de reguladores de crescimento, entre os quais as auxinas, que são conhecidas por desempenhar papel importante nesse tipo de resposta morfogênica. (KHALAFALLA *et al.*, 2009; NANDAGOPAL; RANJITHA KUMARI, 2007; ROSE *et al.*, 2006). No entanto, as auxinas não são os únicos reguladores de crescimento que modulam a formação de raízes. A utilização de citocininas em baixas concentrações pode induzir à formação de raízes, embora em altas concentrações estas substâncias apresentem efeito inibitório. (LLORET; CASERO, 2002; VUYLSTEKER *et al.*, 1998). Considerando as diferentes exigências dos vegetais em relação à suplementação hormonal, no presente trabalho foi investigada a atuação de diferentes fitoreguladores (ANA, AIB, AIA, 2,4-D e KIN) sobre a indução e crescimento de culturas de raízes de *C. rosea*.

Explantes radiculares de plantas propagadas *in vitro* foram utilizados para dar início às culturas de raízes de *C. rosea*, o mesmo tendo sido verificado nos estudos com culturas de *Hypericum perforatum* (GOEL *et al.*, 2009; ZOBAYED; SAXENA, 2003), *Raphanus sativus* (BETSUI; TANAKA-NISHIKAWA; SHIMOMURA, 2004), *Karwinskia humboldtiana* (KOLLÁROVÁ *et al.*, 2004), *Saussurea involucrata* (FU *et al.*, 2006) e *Orthosiphon stamineus* (LING *et al.*, 2009). Culturas de raízes de *Echinacea angustifolia* foram iniciadas a partir de explantes radiculares de plantas cultivadas *ex vitro*. (WU *et al.*, 2006). Outros tipos de materiais vegetais também podem ser usados para dar início a sistemas de cultivo *in vitro* de raízes, com destaque para explantes foliares (BAQUE; HAHN; PAEK, 2010a; KHALAFALLA *et al.*, 2009; LING *et al.*, 2009; PANDEY; CHERIAN; PATANI, 2010; PRAVEEN *et al.*, 2009; SIVANESAN; JEONG, 2009; YOSHIMATSU *et al.*, 2004), explantes caulinares (LING *et al.*, 2009; SIVANESAN; JEONG, 2009; SUDHA; SEENI,

2001) e calos (ARORA *et al.*, 2009; CHOI *et al.*, 2000; GOEL; KUKREJA; BISHT, 2009; KIM *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2009).

A produção *in vitro* de raízes de *C. rosea* foi avaliada previamente por Simões e colaboradores (2009a). No trabalho em questão, segmentos radiculares medindo 2,0 centímetros foram inoculados em meio suplementado com diferentes concentrações de ANA, apresentando correlação positiva entre a concentração dessa auxina e o acúmulo de biomassa, tanto em culturas iniciadas a partir de segmentos proximais quanto a partir de segmentos medianos, embora o crescimento tenha sido maior neste último caso. Segundo os autores, essa diferença na capacidade de multiplicação pode estar relacionada à estrutura anatômica, tendo em vista que os segmentos medianos são formados predominantemente por tecidos primários, os quais apresentam elevada capacidade de divisão celular quando comparados àqueles que demonstram crescimento secundário.

No presente trabalho, as culturas de raízes também foram iniciadas a partir de segmentos radiculares proximais e medianos, porém com 0,4-0,5 cm de comprimento, em função da necessidade de se utilizar explantes de tamanho reduzido nos experimentos de criopreservação, uma vez que a desidratação e congelamento ocorrem de forma mais rápida e uniforme em estruturas menores (SANTOS, 2000). Em contraste com o trabalho anterior (SIMÕES *et al.*, 2009b), os maiores valores de acúmulo de biomassa ocorreram em presença de 0,25 mg.L⁻¹ do fitorregulador ANA (menor concentração testada), não havendo diferença entre as culturas iniciadas a partir de explantes proximais e aquelas iniciadas a partir de explantes medianos.

Nas culturas de raízes estabelecidas no presente estudo, novas raízes se formaram por organogênese direta, a partir dos explantes radiculares de *C. rosea*, após uma ou duas semanas de cultivo em meio suplementado com auxina. Estudos indicam que as células do periciclo são responsáveis pela formação dos primórdios radiculares os quais darão origem às raízes laterais. No desenvolvimento vegetal, as auxinas atuam de forma regulatória no início da formação, na organização do meristema apical e, finalmente, na emergência e subsequente crescimento das raízes laterais a partir do periciclo. (KIM *et al.*, 2003; LLORET; CASERO, 2002; ROSE *et al.*, 2006).

Kim e colaboradores (2003) descreveram a ontogenia da formação de raízes laterais em explantes radiculares de *Panax ginseng* em função da presença de diferentes auxinas (AIB e ANA) no meio de cultura. Os autores relatam que, com uma semana de cultivo, a presença de ambos os fitorreguladores induziu a formação de primórdios radiculares laterais a partir do periciclo dos explantes, ao passo que na ausência de suplementação hormonal nenhum

primórdio radicular lateral se formou. Além disso, através de análises histológicas foi possível concluir que a auxina sintética ANA foi mais eficiente no estímulo à divisão celular.

No cultivo de raízes de *C. rosea*, a adição das auxinas ANA, AIB ou AIA resultou em aumento na indução de raízes laterais, em comparação com o cultivo sem suplementação hormonal. Os fitorreguladores ANA e AIB apresentaram similaridades quanto à indução de raízes e acúmulo de biomassa. No entanto, somente a suplementação com ANA proporcionou manutenção satisfatória do crescimento das raízes ao longo de sucessivas subculturas. Em concordância, o fitorregulador ANA foi mais eficiente na indução de raízes e produção de biomassa em culturas de raízes de *Karwinskia humboldtiana* (KOLLAROVÁ *et al.*, 2004), *Andrographis paniculata* (PRAVEEN *et al.*, 2009) e *Plumbago zeylanica* (SIVANESAN; JEONG, 2009), quando comparado aos fitorreguladores AIA e AIB. No cultivo de raízes de *Rauwolfia serpentina*, a suplementação com o fitorregulador ANA foi imprescindível para a indução de raízes adventícias. (PANDEY; CHERIAN; PATANI, 2010).

Embora os valores de peso fresco das culturas de raízes de *C. rosea* em meio suplementado com a maior concentração de ANA testada ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) tenham sido maiores ao longo das subculturas, foi possível observar que com os valores de peso seco não ocorreu o mesmo. Esse fato sugere que o aumento de biomassa fresca, em função do aumento na concentração desse fitorregulador, está associado à maior quantidade de água nos tecidos. Resultado semelhante foi observado por Kollárová e colaboradores (2004) no cultivo de raízes de *Karwinskia humboldtiana*, onde a maior concentração de ANA testada resultou em maior peso fresco e menor peso seco das culturas. Os autores apontam a presença de calos nas culturas de *K. humboldtiana* cultivadas sob essa condição, conforme o observado no cultivo *in vitro* de raízes de *C. rosea*. A formação de calos em culturas de raízes devido à adição de ANA tem sido relatada para outras espécies. Culturas de raízes de *Decalepis arayalpathra* (SUDHA; SEENI, 2001), *Panax ginseng* (KIM *et al.*, 2003), *Cayratia trifolia* (ARORA *et al.*, 2009) e *Morinda citrifolia* (BAQUE; HAHN; PAEK, 2010a) também apresentaram formação de calos em elevadas concentrações de ANA. Além da calogênese, produção de raízes por organogênese indireta pôde ser observada em *Plumbago zeylanica*, quando as culturas foram suplementadas com esse regulador de crescimento. (SIVANESAN; JEONG, 2009). Porém, em culturas de raízes de *Andrographis paniculata*, ANA foi a melhor auxina na indução de raízes adventícias a partir de explantes foliares, sem induzir etapa de formação de calos. (PRAVEEN *et al.*, 2009). Nesse contexto, Baque e colaboradores (2010a) apontam a necessidade da seleção de culturas de raízes livres de calos, uma vez que estes formam estruturas compactas que dificultam a manipulação e subcultivo.

Diversos trabalhos têm sugerido que a resposta de multiplicação de raízes, em função da presença de fitorreguladores, pode variar de espécie para espécie, onde o envolvimento de auxinas na indução da formação de raízes é dependente do balanço entre os níveis endógenos e exógenos dessa classe de regulador. (BAQUE; HAHN; PAEK, 2010b; WU *et al.*, 2006). Dentro desse propósito, ANA e AIB têm se mostrado mais efetivos do que a auxina natural AIA. (BAQUE; HAHN; PAEK, 2010b).

Nos experimentos realizados com raízes de *C. rosea*, a suplementação com AIB também resultou em elevados valores de massa fresca e seca, quando realizada nas concentrações de 0,50 e 1,0 mg.L⁻¹, embora essa característica não tenha se mantido ao longo das subculturas. Esse fitorregulador tem sido aplicado em diversos sistemas de cultivo de raízes, apresentando bons resultados para as espécies *Panax ginseng* (CHOI *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2003), *Raphanus sativus* (BETSUI; TANAKA-NISHIKAWA; SHIMOMURA, 2004), *Karwinskia humboldtiana* (KOLLÁROVÁ *et al.*, 2004), *Echinacea aungustifolia* (WU *et al.*, 2006), *Vernonia amygdalina* (KHALAFALLA *et al.*, 2009) e *Morinda citrifolia* (BAQUE; HAHN; PAEK, 2010a).

De modo geral, mesmo as culturas de raízes de *C. rosea* estabelecidas em meio acrescido da auxina ANA demonstraram declínio no crescimento, o qual foi mais evidente a partir da quarta subcultura. Sudha e Seeni (2001) sugerem que a possível causa desse declínio seria o acúmulo de auxinas endógenas durante várias subculturas. Em concordância, George (2008) destaca a ocorrência de indução de dormência meristemática, relacionada ao tempo no qual as raízes estão crescendo *in vitro*. Este autor afirma que essa condição promove o acúmulo de auxinas nos ápices radiculares, impedindo que ocorram novas multiplicações mesmo após subcultivo para meio de cultura novo.

Nesse sentido, a perda da capacidade de diferenciação tem sido apontada como uma das principais dificuldades na manutenção, por longos períodos de tempo, de culturas de raízes não transformadas. Sendo assim, considerando o potencial biotecnológico desse material, bem como sua aplicabilidade em estudos farmacológicos e fitoquímicos, torna-se necessário o estabelecimento de métodos, como a criopreservação, para sua conservação em longo prazo.

As técnicas de criopreservação mais adotadas baseiam-se na vitrificação ou formação do estado vítreo, processo no qual a água sofre uma transição da fase líquida para um estado sólido amorfo e meta-estável. Um requisito importante para que ocorra a vitrificação do protoplasma é a desidratação dos tecidos para um teor de umidade em que não exista água livre para a formação de cristais de gelo, quando o material for imerso em nitrogênio líquido

(-196 °C). (GONZALEZ-ARNAO *et al.*, 2008). Tratamentos que resultem em baixo teor de água nas células, mas não causem a morte celular, constituem um fator essencial para o sucesso da técnica. (SHIBLI *et al.*, 2001).

Na criopreservação de materiais vegetais, o pré-tratamento ou pré-cultivo em meio de cultura enriquecido com açúcares e poliálcoois, como sacarose, glicose, sorbitol e manitol, é frequentemente utilizado. (SUZUKI *et al.*, 2006; TURNER *et al.*, 2001; YUANYUAN *et al.*, 2009). Para os experimentos de criopreservação de raízes de *Cleome rosea* foram utilizados pré-tratamentos em meios de cultura líquidos suplementados com elevadas concentrações de sacarose. A sacarose diminui a quantidade de água congelável presente nas células, devido à sua ação osmótica, melhorando sua tolerância ao congelamento. (SUZUKI *et al.*, 2006; TURNER *et al.*, 2001; YOON; POPE; WOLFE, 1998). Alguns autores sugerem que a concentração de sacarose, bem como outros açúcares endógenos, aumenta significativamente nos explantes durante o pré-tratamento. (SAKAI; HIRAI; NIINO, 2008; SUZUKI *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2005). Ao passo que outros trabalhos apontam a capacidade da sacarose de penetrar nas células, contribuindo para a manutenção da viabilidade celular. (HALMAGY; PINKER, 2006).

Outras funções da sacarose seriam a redução do ponto de congelamento da água (YOON; POPE; WOLFE, 1998); a atuação como soluto compatível na proteção das macromoléculas e membranas celulares durante a desidratação (HOEKSTRA *et al.*, 2001; TOLDI; TUBA; SCOTT, 2009), quando a água ainda está presente no citoplasma, e como substituta da água quando a hidratação é perdida gradativamente. Neste último caso, as moléculas de sacarose interagem com as proteínas e fosfolipídios através de ligações de hidrogênio (BENSON, 1990; HOEKSTRA *et al.*, 2001; TURNER *et al.*, 2001), contribuindo para a formação de uma camada de hidratação vítrea amorfa (KOSTER *et al.*, 2000; WOLFE; BRYANT, 1999) e consequente estabilização das membranas celulares durante a desidratação e congelamento (TURNER *et al.*, 2001). Solutos compatíveis são aqueles que podem ser acumulados em grandes quantidades sem produzir efeitos tóxicos para as células. (WOLFE; BRYANT, 2001).

Na natureza, as plantas podem apresentar tolerância ao resfriamento devido à exposição gradual a temperaturas baixas. Esse processo compreende vários mecanismos adaptativos, entre eles o acúmulo de solutos compatíveis como, por exemplo, sacarose, trealose e sorbitol. (JOHNSTON; HARDING; BENSON, 2007; WOLFE; BRYANT, 2001; YOON *et al.*, 1998; YUANYUAN *et al.*, 2009). Para simular tais respostas adaptativas, diversos materiais vegetais têm sido expostos a elevadas concentrações de açúcares durante os

tratamentos de criopreservação, caracterizando assim um procedimento que tem apresentado sucesso, principalmente quando aplicado a germoplasmas tropicais sensíveis ao resfriamento. (JOHNSTON; HARDING; BENSON, 2007; SEN-RONG; MING-HUA, 2009).

Muitos estudos de criopreservação de explantes radiculares utilizam um pré-tratamento em meio de cultura suplementado com 0,3 M de sacarose, por períodos de até três dias. (HIRATA *et al.*, 2002; JUNG *et al.*, 2001; LAMBERT *et al.*, 2009; XUE *et al.*, 2008; YOSHIMATSU; YAMAGUCHI; SHIMOMURA, 1996). No entanto, algumas espécies podem ser sensíveis à exposição direta a elevadas concentrações de sacarose, resultando em efeitos deletérios para a sobrevivência do explante. (WANG *et al.*, 2005). Em experimentos prévios realizados com raízes de *C. rosea* (dados não mostrados) foi utilizado um pré-tratamento com 0,3 M de sacarose por três dias, no qual nenhum segmento criopreservado com solução de vitrificação PVS2 apresentou recuperação após criopreservação. Wang e colaboradores (2005) relatam que, nesses casos, um progressivo aumento na concentração de sacarose pode contribuir para o sucesso na recuperação do material. Sendo assim, no presente trabalho, segmentos radiculares de *C. rosea* foram submetidos a um pré-tratamento com concentrações crescentes de sacarose (0,2 e 0,4 M), permanecendo em cada concentração por dois dias.

Na etapa de pré-tratamento, a suplementação com o fitorregulador ANA contribuiu para o aumento nas frequências de recuperação dos explantes radiculares de *C. rosea* submetidos à criopreservação com as soluções de vitrificação PVS2 e PVS3. Resultado semelhante foi obtido na criopreservação de raízes transformadas geneticamente (*hairy roots*) de *Panax ginseng*, cujas frequências de sobrevivência foram de 54% e 28% quando foram utilizados pré-tratamentos suplementados com os fitorreguladores 2,4-D e AIA, respectivamente, contrastando com o tratamento sem suplementação hormonal, onde não foi obtida sobrevivência do material. (YOSHIMATSU; YAMAGUCHI; SHIMOMURA, 1996). Os autores sugerem que o pré-tratamento com auxina contribuiu para o favorecimento da viabilidade celular antes do congelamento e destacam também o papel desse tipo de fitorregulador no estímulo à divisão celular.

Nos protocolos de criopreservação baseados em vitrificação, os explantes são expostos a uma solução de vitrificação antes da imersão em nitrogênio líquido. No entanto, a exposição direta a essa solução sem uma etapa de osmoproteção pode resultar em efeitos danosos aos tecidos, devido à possibilidade de estresse osmótico, resultante da elevada concentração dessas soluções, ou toxicidade química, que têm sido descritos como os principais fatores determinantes para o sucesso de um protocolo de criopreservação. (GONZALEZ-ARNAO *et*

al., 2008; SAKAI, 2004; WANG *et al.*, 2002). Um tratamento prévio com crioprotetores em concentrações intermediárias tem resultado em significativo aumento da tolerância à desidratação em explantes de diversas espécies. (SAKAI, 2004). Nishizawa e colaboradores (1993) propuseram a utilização de uma solução contendo 2 M de glicerol e 0,4 M de sacarose antes da exposição à solução de vitrificação. Essa solução, chamada de “solução de *Loading*”, tem sido aplicada nos protocolos de criopreservação durante um período 10 a 20 minutos, com o objetivo de preparar os explantes para a solução de vitrificação (SAKAI, 2004).

Na criopreservação de raízes de *C. rosea* com as soluções PVS2 e PVS3, o tratamento com solução de *Loading* não resultou em diferenças significativas nas frequências de recuperação dos explantes, quando comparado aos valores de recuperação obtidos na ausência dessa solução, em um mesmo protocolo. Xue e colaboradores (2008), em trabalho realizado com *hairy roots* da espécie *Eruca sativa*, apontam resultado semelhante, no qual o uso da solução de *Loading* elevou a frequência de sobrevivência de 67,8% para 72,7%, porém sem resultar em diferença significativa entre os valores. Por outro lado, neste mesmo trabalho, a frequência de sobrevivência dos explantes radiculares de *Astragalus membranaceus*, tratados com esta solução protetora, foi reduzida, variando de 6,6% para 0%. Em outro estudo, o tratamento com solução de *Loading* apresentou efeito positivo na viabilidade dos explantes radiculares de *Maesa lanceolata* e *Medicago truncatula* quando estes foram expostos a protocolos de vitrificação com PVS2, porém sem imersão em nitrogênio líquido. (LAMBERT *et al.*, 2009).

Para completar o processo de vitrificação, os explantes são tratados com soluções crioprotetoras específicas, as quais contribuem para a sobrevivência a temperaturas criogênicas. Desde a sua descoberta, diversas variações na composição dessas soluções têm sido desenvolvidas (VOLK; WALTERS, 2006). Essas soluções são conhecidas como soluções de “vitrificação” ou “vitrificantes” para enfatizar seu papel na prevenção à formação de gelo, durante resfriamento e descongelamento, e na estabilização de estruturas celulares, através do estabelecimento de um estado vítreo nos domínios aquosos das células. (GONZALEZ-ARNAO *et al.*, 2008; VOLK; WALTERS, 2006).

A maioria das soluções de vitrificação é constituída de uma mistura de substâncias crioprotetoras penetrantes e não penetrantes. Os crioprotetores penetrantes mais utilizados na criopreservação de plantas são o glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), metanol e etanol, os quais apresentam propriedades coligativas que contribuem para o aumento da osmolaridade inicial da célula, elevação da viscosidade e redução do ponto de resfriamento da solução celular. (BENSON, 2008a; SIOW; RADES; LIM, 2008; VOLK; HARRIS;

ROTINDO, 2006). Outra função importante seria o potencial antioxidante de alguns desses crioprotetores, como o DMSO e o glicerol. (BENSON, 1990). Volk e Walters (2006) contribuíram para a elucidação do modo de ação da mistura crioprotetora conhecida como PVS2 (30% de glicerol, 15% de etilenoglicol, 15% de DMSO e 0,4 M de sacarose; Sakai *et al.*, 1990). Segundo os autores, os constituintes penetrantes dessa solução substituem uma parte da água celular e modificam o ambiente de resfriamento da água que ainda restar nas células, moderando os efeitos osmoticamente ativos dos componentes não penetrantes. Estes últimos são representados principalmente pelos açúcares e poliálcoois, também utilizados nas etapas de pré-tratamento.

Devido à necessidade de se utilizar elevadas concentrações desses crioprotetores, o tratamento com soluções de vitrificação pode resultar em dificuldades durante a criopreservação, como resultado do seu potencial tóxico. (BENSON, 1990; HALMAGY; PINKER, 2006; KAMI *et al.*, 2008). Sendo assim, a utilização dessas substâncias durante a criopreservação deve levar em consideração fatores como: concentração, tempo de exposição a soluções crioprotetoras e temperatura na qual essa exposição ocorrerá. (WOLFE; BRYANT, 2001). Todas as condições devem ser cuidadosamente estabelecidas para obter suficiente proteção dos explantes, sem que ocorra morte celular. (HALMAGY; PINKER, 2006; VOLK; HARRIS; ROTINDO, 2006).

Estudos indicam que quando crioprotetores são adicionados ao meio extracelular, a resposta osmótica inicial da célula é a contração, devido à mobilidade das moléculas de água através da membrana celular. À medida que os crioprotetores penetram na célula, o processo de desidratação se torna mais lento. (RUBINSKY, 2003). No entanto, se o tempo de exposição à solução de vitrificação for muito longo, a desidratação torna-se excessiva, resultando em danos para a célula. (WOLFE; BRYANT, 2001). Outros trabalhos investigam a toxicidade individual dos crioprotetores e relatam o efeito negativo do glicerol, na sobrevivência de explantes criopreservados de *Mentha piperita*, sendo potencializado pela ação surfactante do DMSO e etilenoglicol (EG) sobre a permeabilidade da membrana, que resulta em aumento da difusão do glicerol. (VOLK; HARRIS; ROTINDO, 2006). Reportam também o poder do DMSO e do EG na desestabilização de bicamadas lipídicas, em modelos experimentais e em materiais vegetais, sob temperaturas elevadas e de forma dependente da concentração. (SIOW; RADES; LIM, 2008).

Tempos de exposição à solução de vitrificação PVS2 superiores a 30 minutos não foram favoráveis para a recuperação dos explantes de *C. rosea*, cujas frequências não ultrapassaram 55%, no protocolo em que o pré-tratamento ocorreu na ausência de

luminosidade e com suplementação de ANA. Em trabalhos semelhantes, foi observado que a exposição à solução PVS2 por um tempo superior a 10 e 15 minutos influenciou de forma negativa na recuperação e formação de raízes laterais de explantes radiculares de *Hyoscyamus niger* e *P. ginseng*, após a criopreservação. (JUNG *et al.*, 2001; OH *et al.*, 2009).

Muitas estratégias têm sido testadas a fim de reduzir a toxicidade das soluções crioprotetoras durante tratamentos de vitrificação. Entre essas estratégias, destacam-se: exposição à solução de vitrificação a baixas temperaturas; redução da concentração de alguns componentes da solução; adição de componentes que podem atuar como neutralizadores da toxicidade e diluição da solução. (KAMI *et al.*, 2008).

Soluções de vitrificação alternativas foram utilizadas nos estudos de criopreservação de raízes de *C. rosea* com base em estudos realizados com outras espécies: PVS3, constituída de 50% de glicerol e 50% de sacarose (NISHIZAWA *et al.*, 1993) e VSL, constituída de 20% de glicerol, 30% de etilenoglicol, 10% de DMSO, 5% de sacarose e 10 mM de CaCl₂ (SUZUKI *et al.*, 2008).

A solução PVS3, considerada menos tóxica por conter somente glicerol e sacarose (NISHIZAWA *et al.*, 1993), quando utilizada após o pré-tratamento na ausência de luminosidade e com suplementação com o fitoregulador ANA, resultou em elevadas frequências de recuperação dos explantes de *C. rosea*, variando entre 45% e 100%, sendo o menor tempo de exposição (15 minutos) mais favorável para o sucesso do protocolo. Em contraste com esse resultado, muitos trabalhos indicam a necessidade de tempos de exposição mais longos quando se trata da solução PVS3, justificando que o glicerol penetraria mais lentamente nas células na ausência do DMSO e do etilenoglicol. (VOLK; HARRIS; ROTINDO, 2006). Em estudo sobre a criopreservação de raízes de *Eruca sativa* usando a solução PVS3, o tempo de exposição de 60 minutos resultou em uma frequência de recuperação de 73,3%. (XUE *et al.*, 2008).

Uma nova solução de vitrificação (VSL), utilizada na criopreservação de gemas axilares de *Gentiana scabra* (SUZUKI *et al.*, 2008), foi testada no estudo de criopreservação de *Cleome rosea*, porém, em todos os protocolos nos quais essa solução foi utilizada não ocorreu recuperação dos explantes após a criopreservação. No trabalho que serviu de base a este estudo, Suzuki e colaboradores (2008) relatam a obtenção de uma elevada taxa de recuperação dos explantes (78 %) de *G. scabra* quando tratados com a solução VSL por 45 minutos. Esta solução apresenta composição semelhante à PVS2, no entanto com outras concentrações dos mesmos crioprotetores e com adição de CaCl₂ que, segundo os autores, teria efeito na estabilidade das membranas celulares. Além disso, os autores comparam as

duas soluções e concluem que a elevada viscosidade da PVS2 pode resultar em lenta penetração dos crioprotetores e/ou baixa desidratação dos tecidos. Ao passo que a VSL contém menos glicerol, DMSO e sacarose e maior concentração de etilenoglicol, o que a torna menos viscosa do que a PVS2 e, provavelmente, resulta em rápido mecanismo de crioproteção, sem perder a capacidade de vitrificação.

A recuperação dos explantes é uma etapa importante na criopreservação. O desenvolvimento de técnicas eficientes de descongelamento e de condições de recultivo pós-criopreservação é crucial para o sucesso de qualquer protocolo (REED, 2008).

O estado vítreo é metaestável, ou seja, pode ser alterado como resultado de alguma pequena perturbação (COLLARES; KIECKBUSCH; FINZER, 2002) e retornar ao estado líquido e/ou desvitrificar em forma de gelo durante o descongelamento, quando a mobilidade molecular e energia são suficientes para que as moléculas de água se reorganizem na forma de cristais (BENSON, 2008b), resultando em danos para as células e tecidos e comprometendo a recuperação dos explantes (SEN-RONG; MING-HUA, 2009). Para evitar recristalização, o descongelamento deve ser realizado de forma rápida através da imersão dos criotubos em banho-maria a aproximadamente 40°C, por poucos minutos. Dessa forma, não há tempo suficiente para que a desvitrificação ocorra. (MAZUR, 2004; SAKAI; ENGELMANN, 2007).

Após o descongelamento, a solução de vitrificação é removida e os explantes são incubados em solução de desintoxicação para remover ou diluir o que ainda restar dos crioprotetores utilizados na solução de *Loading* e de vitrificação. Essa solução de desintoxicação, também chamada de *unloading*, tem como base o meio de cultura padrão suplementado com 1,2 M de sacarose e impede que os explantes sofram com o choque osmótico, ou seja, o resultado da diferença entre os potenciais osmóticos da solução de vitrificação e do meio de cultura padrão. (GONZALEZ-ARNAO *et al.*, 2008; SAKAI; HIRAI; NIINO, 2008).

Nos experimentos de criopreservação de *C. rosea*, os segmentos radiculares descongelados foram expostos à solução de desintoxicação (1,2 M de sacarose) por 30 minutos. Em seguida, o material foi submetido a um pós-tratamento com as mesmas concentrações de sacarose utilizadas no pré-tratamento, porém de forma decrescente. Ainda nesta etapa, também foram testadas outras condições: a suplementação com a auxina ANA e a ausência de luminosidade. Este último parâmetro tem sido utilizado na maioria dos trabalhos de criopreservação. Sen-Rong e Ming-Hua (2009) afirmam que as condições de luminosidade, tanto antes quanto depois do congelamento, podem influenciar na recuperação dos explantes e sugerem que possíveis reparos teciduais podem ser favorecidos quando os

explantes são mantidos no escuro durante o período de recuperação. Em concordância, Benson (1990) menciona que essa condição é extremamente necessária para prevenir danos decorrentes da foto-oxidação.

Após a etapa de pós-tratamento, os explantes são inoculados em meio de recultivo. Em alguns casos, nessa etapa, a suplementação com aditivos como ácido giberélico, citocininas e auxinas é necessária para favorecer a recuperação dos explantes (BENSON, 1990; PANIS, 2008). No presente trabalho, o meio de recultivo e, em alguns protocolos, o meio de pós-tratamento foram suplementados com a auxina ANA, a qual se mostrou mais efetiva para recuperação e multiplicação de raízes quando empregada na concentração de $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$, em concordância com os resultados obtidos nos experimentos de cultura de raízes. Na criopreservação de *hairy roots* de *Beta vulgaris*, a suplementação do meio de recultivo com os fitorreguladores AIA, ANA ou 2,4-D não foi favorável para a recuperação dos explantes (BENSON; HAMILL, 1991). No mesmo trabalho, a frequência de recuperação dos explantes radiculares de *Nicotiana rustica* aumentou em presença de AIA e 2,4-D. Os autores destacaram que a formação de raízes a partir dos explantes criopreservados ocorreu via organogênese indireta e apontaram a participação dessas auxinas no estímulo à formação de calos.

Benson (1990) afirma que o efeito benéfico dos fitorreguladores em relação à sobrevivência pós-criopreservação pode vir acompanhado do desenvolvimento de resposta morfogênica indireta. Uma vez que a ocorrência de variação somaclonal está associada ao crescimento desorganizado, um protocolo que evite esse tipo de resposta é essencial para preservar a estabilidade genética de materiais vegetais conservados por criopreservação.

Mesmo sendo inoculados em meio com suplementação hormonal, os explantes de *C. rosea* apresentaram resposta de multiplicação tardia (durante a terceira semana após início de recultivo), quando comparados aos segmentos que não foram criopreservados, nos quais a resposta ocorreu durante a segunda semana de cultivo. Teoh e colaboradores (1996) observaram essa mesma diferença em relação aos segmentos de *hairy roots* de *Artemisia annua* criopreservados e os segmentos do controle, atribuindo esse fato ao tempo requerido para o reparo dos possíveis danos celulares e/ou para o recomeço das divisões celulares e consequente crescimento. Os autores também verificaram a ocorrência desse retardo no crescimento após o congelamento em outros trabalhos de criopreservação.

As culturas de raízes estabelecidas a partir de explantes submetidos ao protocolo de criopreservação mais eficiente com a solução PVS2 foram acompanhadas por sucessivas subculturas, apresentando crescimento comparável ao observado em culturas de raízes não

criopreservadas. De forma semelhante, as culturas de raízes de *Astragalus membranaceus* e de *Gentiana macrophylla* não apresentaram diferenças em suas taxas de crescimento após a criopreservação, quando comparadas àquelas que não foram criopreservadas. (XUE *et al.*, 2008). Ao passo que as culturas de *Hyoscyamus niger* e *P. ginseng* demonstraram aumento no acúmulo de biomassa após a criopreservação. (JUNG *et al.*, 2001; OH *et al.*, 2009).

Embora a criopreservação seja uma ferramenta que permite a conservação de germoplasmas vegetais por longos períodos, contribuindo para a redução dos riscos de perda da diversidade genética, os procedimentos empregados podem causar estresse e danos de diversas naturezas (físicos, químicos e fisiológicos) nos tecidos vegetais. Apesar dos efeitos desses eventos no genoma não serem bem compreendidos, podem ocorrer variações, não devido à criopreservação em si, mas como resultado do conjunto de processos de cultivo *in vitro*, criopreservação e regeneração (HARDING, 2004), os quais podem causar efeitos negativos para a estabilidade genética do material e induzir variação somaclonal (AHUJA *et al.*, 2002). Considerando esses aspectos, para que um protocolo de criopreservação seja efetivamente útil, o monitoramento da estabilidade genética é essencial. (AHUJA *et al.*, 2002; CASTILLO *et al.*, 2010; URBANOVÁ; KOSUTH; CELLÁROVÁ, 2006). Nos últimos anos tem sido crescente a quantidade de estudos de estabilidade genética associados a procedimentos de criopreservação, nos quais são empregadas várias técnicas, como o uso de marcadores moleculares RAPD e AFLP.

No presente estudo, a técnica utilizada baseou-se em marcadores moleculares RAPD, os quais permitem uma varredura aleatória do genoma de forma relativamente simples, rápida e de baixo custo. Mesmo sendo uma técnica questionada quanto às dificuldades de se manter sua reprodutibilidade, ainda representa uma ferramenta muito utilizada em estudos com essa proposta (AHUJA *et al.*, 2002; MARTÍN; GONZÁLEZ-BENITO, 2005).

O monitoramento da estabilidade genética de regenerantes de *C. rosea* obtidos após a criopreservação pelo método de vitrificação foi realizado através da comparação de um mesmo germoplasma vegetal antes e depois da imersão em nitrogênio líquido. Foram utilizadas três culturas de raízes desenvolvidas a partir de segmentos radiculares, de três plantas específicas, submetidos à criopreservação, sendo detectados polimorfismos significativos em umas das culturas de raízes analisadas. Em estudo realizado com *Dioscorea floribunda*, uma das nove plantas avaliadas após a criopreservação de ápices caulinares apresentou uma banda polimórfica na amplificação com um dos dez *primers* testados, de um total de 5120 bandas analisadas. (AHUJA *et al.*, 2002). Os autores sugerem que esse único polimorfismo pode ser interpretado como resultado de uma variação genética ou epigenética,

necessitando de estudos adicionais como, por exemplo, os que detectam eventos de metilação. Na análise da estabilidade genética de plantas de *Dendranthema grandiflora*, obtidas a partir de ápices caulinares criopreservados, somente um regenerante apresentou três bandas polimórficas na amplificação com um dos *primers* testados, de um total de 4944 bandas. (MARTÍN; GONZÁLEZ-BENITO, 2005). Neste caso, a ocorrência desses polimorfismos não foi considerada pelos autores como uma evidência consistente de que o protocolo causa instabilidade genética. Helliot e colaboradores (2002) observaram que somente um *primer* amplificou uma única banda polimórfica que se repetiu em 72% e 45% dos regenerantes criopreservados e não criopreservados de *Prunus*, respectivamente. E destacaram que o baixo número de bandas obtidas (565) na análise RAPD pode não ter sido suficiente para atingir todo genoma e descartar, dessa forma, a possibilidade de alteração genética resultante da criopreservação.

A maioria dos trabalhos que avaliam a estabilidade genética após a criopreservação não encontram variações nos regenerantes. Quando alguma diferença é encontrada, a causa é atribuída ao processo de cultivo e regeneração *in vitro*, associados ao processo de criopreservação. (MARTÍN; GONZÁLEZ-BENITO, 2005).

Vale destacar que algumas mudanças genéticas (pontos de mutações raras, presenças de cópias extra de alguns genes, variação no número de cromossomos etc.) podem não ser detectadas por marcadores moleculares. Isso se deve ao fato de que essas técnicas não são capazes de avaliar o genoma em sua totalidade. (HARDING, 2004; MARTÍN; GONZÁLEZ-BENITO, 2005). Sendo assim, o uso de um único marcador molecular pode subestimar a possibilidade de instabilidade genética, tornando necessária a associação entre duas ou mais técnicas.

Nesse sentido, faz-se necessária a realização de novos estudos de monitoramento da estabilidade genética de regenerantes de *Cleome rosea* criopreservados, de forma que um número maior de amostras e produtos de amplificação sejam avaliados, inclusive através da utilização de outros marcadores moleculares.

A partir dos estudos aqui realizados, foi possível a produção massal de raízes de *C. rosea* sob condições *in vitro* e o estabelecimento de protocolos para a conservação do material em longo prazo, iniciando estudos inéditos de criopreservação e análise da estabilidade genética da espécie e viabilizando a sua conservação e exploração medicinal.

5 CONCLUSÕES

⇒ A produção de raízes *in vitro*, a partir de explantes radiculares (0,4 - 0,5 cm), foi obtida com o fitorregulador ANA, adicionado ao meio de cultura na concentração de 0,25 mg.L⁻¹, que mostrou-se mais eficiente do que os demais testados, tendo em vista o crescimento e aspecto fenotípico das raízes;

⇒ O uso de segmentos radiculares tanto proximais quanto medianos mostrou-se adequado ao estabelecimento das culturas de raízes;

⇒ As culturas estabelecidas em meio suplementado com ANA foram mantidas por até quatro subculturas com expressivo acúmulo de biomassa;

⇒ Foram estabelecidos protocolos eficientes de criopreservação de *C. rosea* a partir da vitrificação de explantes radiculares, permitindo a sobrevivência de até 100% dos segmentos com o uso da solução PVS3;

⇒ A avaliação da estabilidade genética, pela técnica de RAPD, apontou polimorfismos significativos em uma das culturas de raízes estabelecidas após a criopreservação, reforçando a utilidade desse marcador no monitoramento genético das culturas de raízes de *C. rosea* criopreservadas.

6 PERSPECTIVAS

Com base nos expressivos resultados alcançados em relação à criopreservação das raízes oriundas de plantas propagadas *in vitro* de *C. rosea*, os protocolos estabelecidos no presente estudo serão aplicados às culturas de raízes da espécie.

REFERÊNCIAS

- AHUJA, S. *et al.* Molecular, phenotypic and biosynthetic stability in *Dioscorea floribunda* plants derived from cryopreserved shoot tips. **Plant Science**, v. 163, p. 971-977, 2002.
- ARIF, I. A. *et al.* A Brief Review of Molecular Techniques to Assess Plant Diversity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 2079-2096, 2010.
- ARORA, J. *et al.* High stilbenes accumulation in root cultures of *Cayratia trifolia* (L.) Domin grown in shake flasks. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 1307-1312, 2009.
- BAQUE, M. A.; HAHN, E. -J.; PAEK, K. -Y. Growth, secondary metabolite production and antioxidant enzyme response of *Morinda citrifolia* adventitious root as affected by auxin and cytokinin. **Plant Biotechnology Reports**, v. 4, p. 1091-16, 2010b.
- BAQUE, M. A.; HAHN, E. -J.; PAEK, K. -Y. Induction mechanism of adventitious root from leaf explants of *Morinda citrifolia* as affected by auxin and light quality. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 46, p. 71-80, 2010a.
- BENSON, E. E. Cryoconserving Algal and Plant Diversity: Historical Perspectives and Future Challenges. In: FULLER, B. J., LANE, N., BENSON, E. E. (Ed.) **Life in the frozen state**. United States of America: CRC Press LLC, 2004. p. 299-327.
- BENSON, E. E. Cryopreservation of Phytodiversity: A Critical Appraisal of Theory & Practice. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 27, n. 3, p. 141-219, 2008a.
- BENSON, E. E. Cryopreservation Theory. In: REED, B. M. (Ed.) **Plant Cryopreservation - A Practical Guide**. New York, USA: Springer, 2008b. p. 15-32.
- BENSON, E. E. **Free Radical Damage in Stored Plant Germplasm**. Rome, Italy: International Board for Plant Genetic Resources, 1990. 140 p.
- BENSON, E. E.; HAMILL, J. D. Cryopreservation and post freezing molecular and biosynthetic stability in transformed roots of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 24, p. 163-172, 1991.
- BENSON, E. E. *et al.* Physical and engineering perspectives of *in vitro* plant cryopreservation. In: GUPTA, S. D.; IBARAKI, Y. (Ed.) **Plant Tissue Culture Engineering**. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2006. p. 441-475.
- BETSUI, F.; TANAKA-NISHIKAWA, N.; SHIMOMURA, K. Anthocyanin production in adventitious root cultures of *Raphanus sativus* L. cv. Peking Koushin. **Plant Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 387-391, 2004.
- BOURGAUD, F. *et al.* Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v.161, p. 839-851, 2001.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH, 1998. v. 1, p. 87-132.

CARVALHO, H. A. L. **Capparaceae Juss. na restinga de Maricá, RJ - Estudo sobre a biologia da reprodução de *Capparis lineata* Domb. ex Pers., *C. flexuosa* (L) L. e *Cleome rosea* Vahl. ex DC.** 2002. Tese (Doutorado), Museu Nacional, UFRJ, Rio de Janeiro, 2002.

CASTILLO, N. R. F. *et al.* Genetic stability of cryopreserved shoot tips of *Rubus* germplasm. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 46, p. 246-256, 2010.

CHOI, S. M. *et al.* Pilot-scale culture of adventitious roots of *ginseng* in a bioreactor system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 62, p. 187-193, 2000.

COLLARES, F.P.; KIECKBUSCH, T. G.; FINZER, J. R. D. Revisão: A Transição Vítrea em Produtos Alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 5, p. 117-130, 2002.

COSTA E SILVA, M. B. **O gênero *Cleome* L. (Capparaceae Juss.) no Brasil.** 2000. 150 f. Tese (Doutorado), UFRPE, Recife, PE, 2000.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants.** NY, USA: Columbia University Press, 1981. 1262 p.

CUI, X. -H. *et al.* Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4708-4716, 2010.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 47, n. 1, p. 5-16, 2010.

ESTEVEZ, F. A.; LACERDA, L. D. **Ecologia de restingas e lagoas costeiras.** Macaé: Núcleo de Pesquisas Ecológicas de Macaé - NUPEM/UFRJ, 2000. 446p.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

FLORES, H. E.; VIVANCO, J. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. 'Radicle' biochemistry: the biology of root-specific metabolism. **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 6, p. 220-226, 1999.

FU, C. -X. *et al.* A comparison between hairy root cultures and wild plants of *Saussurea involucreata* in phenylpropanoids production. **Plant Cell Reports**, v. 24, p. 750-754, 2006.

FULZELE, D. P.; SATDIVE, R. K.; POL, B. B. Untransformed root cultures of *Nothapodytes foetida* and production of camptothecin. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 285-288, 2002.

GAO, X. *et al.* Induction and characterization of adventitious roots directly from the explants of *Panax notoginseng*. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 1771-1775, 2005.

GEORGE, E. F. Plant Tissue Culture Procedure - Background. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. -J. (Ed.) **Plant Propagation by Tissue Culture**, 3rd ed. The Netherlands: Springer, 2008. p. 1-28.

GEORGE, E. F.; DEBERGH, P. C. Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. -J. (Ed.) **Plant Propagation by Tissue Culture**, 3rd ed. The Netherlands: Springer, 2008. p. 29-65.

GOEL, M. K.; KUKREJA, A. K.; BISHT, N. S. In vitro manipulations in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) for incessant and scale up micropropagation using adventitious roots in liquid medium and assessment of clonal fidelity using RAPD analysis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 96, p. 1-9, 2009.

GONZALEZ-ARNAO, M. T. *et al.* Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 92, p. 1-13, 2008.

HALL, J. C.; SYTSMA, K. J.; ILTIS, H. H. Phylogeny of Capparaceae and Brassicaceae based on chloroplast sequence data. **American Journal of Botany**, v. 89, p. 1826-1842, 2002.

HALMAGY, A.; PINKER, I. Plant regeneration from Rosa shoot tips cryopreserved by a combined droplet vitrification method. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 84, p. 145-153, 2006.

HARDING, K. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. **Cryoletters**, v. 25, p. 3-22, 2004.

HARDING, K.; JOHNSTON, J.; BENSON, E. E. Plant and algal cell cryopreservation: issues in genetic integrity, concepts in 'Cryobionomics' and current European applications in cryobiology. In: **Australian Branch of the IAPTC&B**, 1., 2005, Perth, Western Australia. Proceedings... Perth, Australia: Bennett, I. J.; Bunn, E.; Clarke, H; McComb, J. A. (Ed.), 2005. p. 112-120.

HELLIOT, B. *et al.* Evaluation of genetic stability in cryopreserved *Prunus*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 38, p. 493-500, 2002.

HIRATA, K. *et al.* Cryopreservation of hairy root cultures of *Vinca minor* (L.) by encapsulation-dehydration. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 371-376, 2002.

HOEKSTRA, F. A. *et al.* Induction of Desiccation Tolerance in Plant Somatic Embryos: How Exclusive Is the Protective Role of Sugars? **Cryobiology**, v. 43, p. 140-150, 2001.

JOHNSTON, J. W.; HARDING, K.; BENSON, E. E. Antioxidant status and genotypic tolerance of *Ribes in vitro* cultures to cryopreservation. **Plant Science**, v. 172, p. 524-534, 2007.

JUDD, W. S. *et al.* **Plant Systematic: A Phylogenetic Approach**. 2nd ed. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates Inc., 2002. 576 p.

JUNG, D. -W. *et al.* Cryopreservation of *Hyoscyamus niger* adventitious roots by vitrification. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, p. 801-805, 2001.

KAMI, D. *et al.* Improved cryopreservation by diluted vitrification solution with supercooling-facilitating flavonol glycoside. **Cryobiology**, v. 57, p. 242-245, 2008.

KARUPPUSAMY, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 13, p. 1222-1239, 2009.

KHALAFALLA, M. M. *et al.* Antileukemia activity from root cultures of *Vernonia amygdalina*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 8, p. 556-562, 2009.

KIM, D. S. *et al.* Improvement of ginsenoside production by *Panax ginseng* adventitious roots induced by γ -irradiation. **Biologia Plantarum**, v. 53, n. 3, p. 408-414, 2009.

KIM, Y. -S. *et al.* Lateral root development and saponin accumulation as affected by IBA or NAA in adventitious root cultures of *Panax ginseng* C.A. Meyer. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 39, p. 245-249, 2003.

KLEIN, A. S.; CITADINI-ZANETTE, V.; SANTOS, R. Florística e estrutura comunitária de restinga herbácea no município de Araranguá, Santa Catarina. **Biotemas**, v. 20, p. 15-26, 2007.

KOLEWE, M. E.; GAURAV, V.; ROBERTS, S. C. Pharmaceutically Active Natural Product Synthesis and Supply via Plant Cell Culture Technology. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 243-256, 2008.

KOLLÁROVÁ, K. *et al.* Effect of auxins on *Karwinskia humboldtiana* root cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, p. 213-221, 2004.

KOSTER, K. L. *et al.* Effects of Vitrified and Nonvitrified Sugars on Phosphatidylcholine Fluid-to-Gel Phase Transitions. **Biophysical Journal**, v. 78, p. 1932-1946, 2000.

KUMAR, P. *et al.* Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. **Plant Omics Journal**, v. 2, n. 4, p. 141-162, 2009.

LAMBERT, E. *et al.* Cryopreservation of hairy root cultures of *Maesa lanceolata* and *Medicago truncatula*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 96, n. 3, p. 289-296, 2009.

LING, A. P. K. *et al.* Effects of Plant Growth Regulators on Adventitious Roots Induction from Different Explants of *Orthosiphon Stamineus*. **American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture**, v. 3, n. 3, p. 493-501, 2009.

LIU, Y.; WANG, X.; LIU, L. Analysis of genetic variation in surviving apple shoots following cryopreservation by vitrification. **Plant Science**, v. 166, p. 677-685, 2004.

LLORET, P. G.; CASERO, P. J. Lateral Root Initiation. In: WAISEL, Y.; ESHEL, A.; KAFKAFI, U. (Ed.) **Plant roots: The Hidden Half**. 3th ed. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 127-155.

MARTÍN, C.; GONZÁLEZ-BENITO, M. E. Survival and genetic stability of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev shoot apices after cryopreservation by vitrification and encapsulation-dehydration. **Cryobiology**, v. 51, p. 281-289, 2005.

MARTIN, K. P. *et al.* Adventitious root induction in *Ophiorrhiza prostrata*: a tool for the production of camptothecin (an anticancer drug) and rapid propagation. **Plant Biotechnology Reports**, v. 2, p. 163-169, 2008.

MARTINS, S. E. *et al.* Caracterização florística de comunidades vegetais de restinga em Bertoga, SP, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 1, p. 249-274, 2008.

MAZUR, P. Principles of cryobiology. In: FULLER, B. J.; LANE, N.; BENSON, E. E. (Ed.) **Life in the frozen state**. United States of America: CRC Press LLC, 2004. p. 5-55.

MCCHESENEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, p. 2015-2022, 2007.

MÜLLER, J. *et al.* Assessing genetic stability of a range of terrestrial microalgae after cryopreservation using amplified fragment length polymorphism (AFLP). **American Journal of Botany**, v. 94, n. 5, p. 799-808. 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v. 15, p. 473-497, 1962.

MURTHY, H. N.; HAHN, E. J.; PAEK, K. -Y. Adventitious Roots and Secondary Metabolism. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 711-716, 2008.

MURTHY, S. S. N. Some Insight into the Physical Basis of the Cryoprotective of Dimethyl Sulfoxide and Ethylene Glycol. **Cryobiology**, v. 36, p. 84-96, 1998.

NANDAGOPAL, S.; RANJITHA KUMARI, B. D. Effectiveness of auxin induced *in vitro* root culture in chicory. **Journal of Central European Agriculture**, v. 8, n. 1, p. 73-80, 2007.

NISHIZAWA, S. *et al.* Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. **Plant Science**, v. 91, p. 67-73, 1993.

OH, S. Y. *et al.* Cryopreservation of *Panax ginseng* Adventitious Roots. **Journal of Plant Biology**, v. 52, p. 348-354, 2009.

PAEK, K. -Y.; CHAKRABARTY, D.; HAHN, E. J. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 287-300, 2005.

PANDEY, V. P.; CHERIAN, E.; PATANI, G. Effect of Growth Regulators and Culture Conditions on Direct Root Induction of *Rauwolfia serpentina* L. (Apocynaceae) Benth by Leaf Explants. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n.1, p. 27-34, 2010.

PANIS, B. Cryopreservation of monocots. In: REED, B. M. (Ed.) **Plant Cryopreservation - A Practical Guide**. New York, USA: Springer, 2008. 241-280.

PASQUA, G. *et al.* Synthesis and/or accumulation of bioactive molecules in the *in vivo* and *in vitro* root. **Plant Biosystems**, v. 139, n. 2, p. 180-188, 2005.

PRAVEEN, N. *et al.* Production of andrographolide from adventitious root cultures of *Andrographis paniculata*. **Current Science**, v. 96, n. 5, p. 694-697, 2009.

RAMACHANDRA RAO, S.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 101-153, 2002.

REED, B. M. Cryopreservation – Practical Considerations. In: Reed, B. M. (Ed.) **Plant Cryopreservation - A Practical Guide**. New York, USA: Springer, 2008. p. 03-13.

ROSE, R. J. *et al.* Root meristems in *Medicago truncatula* tissue culture arise from vascular-derived procambial-like cells in a process regulated by ethylene. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 10, p. 2227-2235, 2006.

RUBINSKY, B. Principles of Low Temperature Cell Preservation. **Heart Failure Reviews**, v. 8, p. 277-284, 2003.

RYYNÄNEN, L.; ARONEN, T. Vitrification, a complementary cryopreservation method for *Betula pendula* Roth. **Cryobiology**, v. 51, p. 208-219, 2005.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. **CryoLetters**, v. 28, n. 3, p. 151-172, 2007.

SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS-Based Vitrification Protocols. In: REED, B. M. (Ed.) **Plant Cryopreservation - A Practical Guide**. New York, USA: Springer, 2008. p. 33-57.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus-Sinensis* Osb Var Brasiliensis Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 30-33, 1990.

SAKAI, A. Plant cryopreservation. In: FULLER, B. J.; LANE, N.; BENSON, E. E. (Ed.) **Life in the Frozen State**. United States of America: CRC Press LLC, 2004. p. 329-345.

SÁNCHEZ-ACEBO, L. A phylogenetic study of new world *Cleome* (Brassicaceae, Cleomoideae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 92, n. 2, p. 179-201, 2005.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 70-84, 2000.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. (Ed.) **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2004. p. 403-434.

SATO, F.; YAMADA, Y. Engineering Formation of Medicinal Compounds in Cell Cultures. In: BOHNERT, H. J.; NGUYEN, H.; LEWIS, N. G. (Ed.) **Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology**. Amsterdam: Elsevier, 2008. v. 1, p. 311-345.

SCHUH, R. T. **Biological Systematics: Principles and applications**. Ithaca, NY, USA: Cornell University Press, 2000. 236p.

SEN-RONG, H. & MING-HUA, Y. High-efficiency vitrification protocols for cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of rare and endangered plant *Emmenopterys henryi* Oliv. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, p. 217-226, 2009.

SHIBLI, R. A. *et al.* Cryopreservation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cells by encapsulation-dehydration. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 445-450, 2001.

SIMÕES, C. *et al.* Anthocyanin production in callus cultures of *Cleome rosea*: Modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ESIMS. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 10, p. 895-903, 2009a.

SIMÕES, C. *et al.* Antiviral activity of *Cleome rosea* extracts from field-grown plants and tissue culture-derived materials against acyclovir-resistant *Herpes simplex* viruses type 1 (ACVr-HSV-1) and type 2 (ACVr-HSV-2). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 93-99, 2010a.

SIMÕES, C. *et al.* Medicinal potential from *in vivo* and acclimatized plants of *Cleome rosea* Vahl ex DC. (Capparaceae). **Fitoterapia**, v. 77, p. 94-99, 2006.

SIMÕES, C. *et al.* New approaches for shoot production and establishment of *in vitro* root cultures of *Cleome rosea* Vahl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 98, p.79-86, 2009b.

SIMÕES, C. *et al.* Shoot organogenesis and plantlet regeneration from stem explants of *Cleome rosea* Vahl (Capparaceae). **Journal of Plant Biotechnology**, v. 6, p. 3, 199-204, 2004.

SIMÕES, C. *et al.* Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Callus Cultures of *Cleome rosea* Vahl. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 3, p. 679-686, 2010b.

SLOW, L. F.; RADES, T.; LIM, M. H. Cryo-responses of two types of large unilamellar vesicles in the presence of non-permeable or permeable cryoprotecting agents. **Cryobiology**, v. 57, n. 3, p. 276-285, 2008.

SIVAKUMAR, G. Bioreactor technology: A novel industrial tool for high-tech production of bioactive molecules and biopharmaceuticals from plant roots. **Biotechnology Journal**, v. 1, p. 1419-1427, 2006.

SIVANESAN, I.; JEONG, B. R. Induction and establishment of adventitious and hairy root cultures of *Plumbago zeylanica* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 20, p. 5294-5300, 2009.

SRIVASTAVA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Hairy Root Culture for Mass-Production of High-Value Secondary Metabolites. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 27, p. 29-43, 2007.

SUBOTIC, A.; JEVREMOVIC, S.; GRUBISIC, D. Influence of cytokinins on *in vitro* morphogenesis in root cultures of *Centaurium erythraea* - Valuable medicinal plant. **Scientia Horticulturae**, v. 120, p. 386-390, 2009.

SUBOTIC, A. *et al.* The influence of gibberellic acid and paclobutrazol on induction of somatic embryogenesis in wild type and hairy root cultures of *Centaurium erythraea* Gillib. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 14, p. 3223-3228, 2009.

SUDHA, C. G.; SEENI, S. Establishment and analysis of fast-growing normal root culture of *Decalepis arayalpathra*, a rare endemic medicinal plant. **Current Science**, v. 81, p. 371-374, 2001.

SUDHA, C. G.; SEENI, S. Spontaneous somatic embryogenesis on *in vitro* root segment cultures of *Rauvolfia micrantha* Hook. F. - a rare medicinal plant. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 42, p. 119-123, 2006.

SUZUKI, M. *et al.* Development of a new vitrification solution, VSL, and its application to the cryopreservation of gentian axillary buds. **Plant Biotechnology Reports**, v. 2, p. 123-131, 2008.

SUZUKI, M. *et al.* Physiological Changes in Gentian Axillary Buds During Two-step Preculturing with Sucrose that Conferred High Levels of Tolerance to Desiccation and Cryopreservation. **Annals of Botany**, v. 97, n. 6, p.1073-1081, 2006.

TAYLOR, M.; SONG, Y. C.; BROCKBANK, K. G. M. Vitrification in tissues preservation: new developments. In: FULLER, B. J.; LANE, N.; BENSON, E. E. (Ed.) **Life in the Frozen State**. United States of America: CRC Press LLC, 2004. p. 604-641.

TEOH, K. H. *et al.* Cryopreservation of Transformed (Hairy) Roots of *Artemisia annua*. **Cryobiology**, v. 33, p. 106-117, 1996.

TOLDI, O.; TUBA, Z.; SCOTT, P. Vegetative desiccation tolerance: Is it a goldmine for bioengineering crops? **Plant Science**, v. 176, p. 187-199, 2009.

TORRES, A. C. *et al.* **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128 p.

TURNER, S. *et al.* Stereochemical arrangement of hydroxyl groups in sugarandpolyalcohol molecules as an important factor in effective cryopreservation. **Plant Science**, v. 160, p. 489-497, 2001.

URBANOVÁ, M.; KOSUTH, J.; CELLÁROVÁ, E. Genetic and biochemical analysis of *Hypericum perforatum* L. plants regenerated after cryopreservation. **Plant Cell Reports**, v. 25, p. 140-147, 2006.

VERPOORTE, R.; CONTIN, A.; MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Phytochemistry Reviews**, v. 1, p. 13-25, 2002.

VINOCUR, B. *et al.* Enhanced bud regeneration in aspen (*Populus tremula* L.) roots cultured in liquid media. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 1146-1154, 2000.

VIVANCO, J. M.; GUIMARÃES, R. L.; FLORES, H. E. Underground Plant Metabolism: The Biosynthetic Potential of Roots. In: WAISEL, Y., ESHEL, A., KAFKAFI, U. (Ed.) **Plant Roots: The Hidden Half**. 3th ed. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 1045-1070.

VOLK, G. M.; HARRIS, J. L.; ROTINDO, K. E. Survival of mint shoot tips after exposure to cryoprotectant solution components. **Cryobiology**, v. 52, p. 305-308, 2006.

VOLK, G. M.; WALTERS, C. Plant vitrification solution lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. **Cryobiology**, v. 52, p. 48-61, 2006.

VUYLSTEKER, C. *et al.* S. Evidence for nitrate reductase expression during initiation of lateral roots by NAA in chicory. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. 323, p. 937-944, 1998.

WANG, Q. *et al.* A simple and efficient cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of 'Troyer' citrange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. × *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.] by encapsulation-vitrification. **Euphytica**, v. 128, p. 135-142, 2002.

WANG, Q. *et al.* Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation–vitrification and encapsulation–dehydration. **Plant Cell Reports**, v. 24, p. 280-288, 2005.

WOLFE, J. & BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, v. 24, p. 438-450, 2001.

WOLFE, J. & BRYANT, G. Freezing, Drying, and/or Vitrification of Membrane-Solute-Water Systems. **Cryobiology**, v. 39, n. 103-129, 1999.

WU, C. -H. *et al.* Optimization of Culturing Conditions for the Production of Biomass and Phenolics from Adventitious Roots of *Echinacea angustifolia*. **Journal of Plant Biology**, v. 49, n.3, p.193-199, 2006.

XUE, S. -H. *et al.* Cold storage and cryopreservation of hairy root cultures of medicinal plant *Eruca sativa* Mill., *Astragalus membranaceus* and *Gentiana macrophylla*. Pall. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 92, p. 251-260, 2008.

YANIV, Z.; BACHRACH, U. Roots as a Source of Metabolites with Medicinal Activity. In: WAISEL, Y., ESHEL, A., KAFKAFI, U. (Ed.) **Plant Roots: The Hidden Half**. 3th ed. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 1071-1091.

YOON, Y. H.; POPE, J. M.; WOLFE, J. The Effects of Solutes on the Freezing Properties of and Hydration Forces in Lipid Lamellar Phases. **Biophysical Journal**, v. 74, p. 1949-1965, 1998.

YOSHIMATSU, K. *et al.* Tropane Alkaloid Production and Shoot Regeneration in Hairy and Adventitious Root Cultures of *Duboisia myoporoides* - *D. leichhardtii* Hybrid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 8, p. 1261-1265, 2004.

YOSHIMATSU, K.; YAMAGUCHI, H.; SHIMOMURA, K. Traits of *Panax ginseng* hairy roots after cold storage and cryopreservation. **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 555-560, 1996.

YUANYUAN, M. *et al.* Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 10, p. 2004-2010, 2009.

ZOBAYED, S. M. A.; SAXENA, P. K. In vitro-grown roots: a superior explant for prolific shoot regeneration of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem') in a temporary immersion bioreactor. **Plant Science**, v. 165, p. 463-470, 2003.