



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

Jamine de Almeida Pettinelli

Conservação *in vitro* de germoplasma de *Petiveria alliacea* L. utilizando cultura de tecidos e criopreservação

Rio de Janeiro

2013

Jamine de Almeida Pettinelli

Conservação *in vitro* de germoplasma de *Petiveria alliacea* L. utilizando cultura de tecidos e criopreservação



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. Área de concentração: Conservação e Utilização da Biodiversidade.

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

Rio de Janeiro

2013

Jamine de Almeida Pettinelli

Conservação *in vitro* de germoplasma de *Petiveria alliacea* L. utilizando cultura de tecidos e criopreservação

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.

Banca examinadora:

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

Prof.^a Dra. Norma Albarello
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

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

Prof. Dr. Adriano Caldeira de Araujo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

À minha família pela dedicação e incentivo em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua proteção e pelo o que vem proporcionando em minha vida.

À Prof^a Dr^a Rachel Gagliardi, mais que uma orientadora para mim, agradeço pela oportunidade da realização desse trabalho, pelo carinho, orientação, dedicação e paciência.

À Prof^a Elisabeth Mansur, pela disponibilização do laboratório para a realização deste trabalho.

À Prof^a Norma Albarello e toda a equipe do Labplan, pela disponibilização do laboratório nos momentos em que precisei.

À Renata, por ser essa pessoa incrível, amiga e super cativante! Obrigada pelos conselhos e por sempre estar disposta a me ajudar.

À Georgia, pelos momentos agradáveis e ajuda que me proporcionou durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Antônio Carlos, pela dedicação e disposição em fazer as fotos do material.

Ao Prof. Sebastião, também pela ajuda na realização das fotos e pela disponibilização da lupa.

Aos professores da Pós-graduação, pelos ensinamentos que fizeram expandir meu conhecimento.

À minha amiga Bianka, por sua experiência, pela enorme ajuda, companheirismo e conselhos no desenvolvimento deste trabalho. E é claro pela sua amizade e momentos divertidíssimos que me proporcionou. Te adoro muito!

À Liane, pela amizade, ajuda na confecção deste trabalho e, é claro, por trazer deliciosas comidas em dias de reunião.

À Leila, por me apresentar aos embriões e por mais que esteja distante, sempre me incentivando com palavras de carinho e conforto.

Aos queridos estagiários do projeto: Nathália, Mariana, Juliana e Luis Gustavo, pela parceria e dedicação.

À toda equipe do Labmit: Isabela, Mariela, Marcela, Ana, Dani, Léo, Thiago, Gabriel, Shirley, Camila e Raphaela, pelas conversas, viagens e momentos divertidos que amenizaram os momentos mais difíceis deste trabalho.

À Capes (Coordenação de aperfeiçoamento pessoal de nível superior), pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Pós graduação em Biologia Vegetal (PGBV) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

A beleza de ser um eterno aprendiz
Gonzaguinh

RESUMO

PETTINELLI, Jamine de Almeida. **Conservação *in vitro* de germoplasma de *Petiveria alliacea* L. utilizando cultura de tecidos e criopreservação.** 2013. 74f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

A implementação de estratégias visando à conservação de espécies medicinais apresenta grande importância, tanto do ponto de vista ecológico quanto econômico. *Petiveria alliacea* L., espécie da família Phytolacaceae, conhecida como guiné, erva-de alho, erva-tipi ou amansa-senhor, pode ser encontrada desde a América Central até a América do Sul. Esta espécie possui ampla utilização medicinal, devido à presença, em sua composição, de vários polissulfetos, como o DTS (dibenziltrissulfeto), com propriedades antifúngica, antineoplásica e imunomodulatória, entre outras. O objetivo deste trabalho foi a conservação *in vitro* de germoplasma de *Petiveria alliacea* obtido de diferentes populações ocorrentes no Rio de Janeiro, através de métodos baseados em cultura de tecidos e criopreservação. Plantas obtidas através da germinação *in vitro* foram utilizadas como matrizes para a micropropagação através da multiplicação de meristemas pré-existentes em meio MS sem reguladores de crescimento, e embriões somáticos foram obtidos de forma direta a partir da cultura de explantes foliares das linhagens estudadas (Magé – MG; Marechal Hermes – MH; Niterói – NT; Vila Isabel – VI e Planta envasada – AL), em presença de PIC (20 μ M) e 2,4D (22,6 μ M), após 60 dias de cultivo. Os ápices caulinares das plantas micropropagadas e os embriões somáticos obtidos foram submetidos à criopreservação através de técnicas de vitrificação, encapsulamento-vitrificação e encapsulamento-desidratação, com a avaliação da pré-cultura e de soluções crioprotetoras (PVS2 e PVS3), em diferentes concentrações e tempos de exposição. Os resultados mostraram uma taxa de 100% de germinação *in vitro*. As condições para a pré-cultura de ápices foram padronizadas, entretanto não foram obtidos resultados positivos após o descongelamento. Por outro lado, os embriões da linhagem AL (linhagem embriogênica em cultura há 24 meses) mantiveram sua capacidade multiplicativa (100%) (embriogênese secundária) quando submetidos à desidratação em sacarose (0,5M) e expostos às soluções de vitrificação PVS2 e PVS3 pelos menores tempos (15 e 30 minutos). Os diferentes meios de recuperação apresentaram respostas variáveis em relação à capacidade multiplicativa dos embriões. O encapsulamento/vitrificação foi a técnica que promoveu maior tolerância dos embriões ao congelamento. A recuperação dos embriões através de multiplicação após a criopreservação abre uma perspectiva de conservação de genótipos com alta produção de polissulfetos, de interesse para a indústria farmacêutica.

Palavras-chave: Planta medicinal. Cultura *in vitro*. Embriões somáticos. Congelamento em NL. Vitrificação. Encapsulamento.

ABSTRACT

The implementation of conservation strategies for medicinal species has great importance, both ecologically and economically. *Petiveria alliacea* L., family Phytolacaceae, known as guinea, garlic-herb, herb-tipi or “amansa-senhor”, can be found from Central America to South America. This species has wide medicinal use, due to the presence of several chemicals in its composition, as polysulfides, with antifungal, anticancer and immunomodulatory properties, among others. The objective of this work was the *in vitro* conservation of *Petiveria alliacea* germplasm obtained from different populations occurring in Rio de Janeiro, through methods based on tissue culture and cryopreservation. The plants derived from *in vitro* germination were used as donors for micropropagation through multiplication of pre-existing meristems on MS medium without growth regulators, and somatic embryos were obtained directly from the leaf explants from the studied strains, in the presence of PIC (20 μ M), after 60 days of culture. Shoot tips from micropropagated plants and somatic embryos were subjected to cryopreservation using vitrification, encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration techniques, with the evaluation of pre-culture and cryoprotectant solutions (PVS2 and PVS3) at different concentrations and exposure times. The results showed a frequency of 100% of propagation of plants derived from *in vitro* germination. The conditions for shoot tips pre-culture were optimized, although no positive results were obtained after thawing. On the other hand, embryos from AL line, maintained their multiplication capacity (100%) when submitted to dehydration in 0.5M sucrose and exposed to the vitrification solutions PVS2 and PVS3 for short periods (15 and 30 minutes). The different recovery media showed variable responses regarding the multiplication capacity of the embryos. The encapsulation / vitrification technique provided the embryos the higher freezing tolerance. Embryo recovery by multiplication after cryopreservation, opens a conservation perspective for genotypes with high polysulfide production, interesting for the pharmaceutical industry.

Keywords: Medicinal plant. *In vitro* culture. Somatic embryos. Freezing in NL. Vitrification. Encapsulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	<i>Petiveria alliacea</i> L.....	26
Figura 2 -	Processo germinativo de sementes de <i>P.alliacea</i> L. (NT) em MS suplementado com AIA 0,6 µM.....	36
Figura 3 -	Desenvolvimento das plântulas de <i>Petiveria alliacea</i> L. germinadas <i>in vitro</i> em diferentes meios de cultura após 30 dias de cultivo.....	37
Figura 4-	Proliferação de embriões somáticos diretamente a partir de explantes foliares de <i>Petiveria alliacea</i> L. cultivados em meio MS suplementado com PIC (20,0 µM), após 60 dias de cultura.....	38
Figura 5 -	Explantes foliares de <i>Petiveria alliacea</i> L. cultivados em meio MS suplementado com 2,4D (22,6 µM), após 60 dias de cultivo.....	39
Figura 6 -	Número de embriões por explante oriundos das diferentes linhagens estudadas, mantidas em meio MS suplementado com PIC (20µM), após 60 dias de cultivo.....	40
Figura 7 -	Acompanhamento da taxa de multiplicação de embriões somáticos da linhagem NT até 120 dias de cultivo.....	41
Figura 8 -	Acompanhamento da taxa de multiplicação de embriões somáticos da linhagem MH até 120 dias de cultivo.....	41
Figura 9 -	Acompanhamento da taxa de multiplicação de embriões somáticos da linhagem VI até 120 dias de cultivo.....	42
Figura 10 -	Início de conversão dos embriões somáticos de <i>Petiveria alliacea</i> L. a plantas em meio MS ½ suplementado com fitagel 2%.....	42
Figura 11 -	Embriões somáticos tratados em diferentes concentrações de sacarose e submetidos ao teste colorimétrico TTC.....	43
Figura 12 -	Embriões somáticos desidratados por sacarose em diferentes concentrações, após 60 dias de cultivo em meio MS½ suplementado com fitagel 2%.....	45

Figura 13 -	Efeito da pré-cultura em sacarose na viabilidade de embriões somáticos submetidos ao PVS2 por 15 min, determinado pelo TTC	46
Figura 14 -	Efeito da pré-cultura em sacarose na viabilidade de embriões somáticos submetidos ao PVS3 por 15 min, determinado pelo TTC	47
Figura 15-	Embriões somáticos submetidos à desidratação pela sacarose a 0,5M e PVS2 15 min não congelados em NL, cultivados em meio MS½ suplementado com fitagel a 2%, após 60 dias de cultivo.....	48
Figura 16-	Multiplicação dos embriões somáticos de <i>Petiveria alliacea</i> L. após 90 dias de cultura em meio MS ½ suplementado com fitagel 2%, pré-tratados com PVS2 (15 min) e congelados em NL.....	50
Figura 17-	Embriões somáticos de <i>Petiveria alliacea</i> L. submetidos ou não ao congelamento em NL e cultivados em meio MS + PIC (20µM) suplementado com diferentes concentrações de BAP	52
Figura 18-	Embriões somáticos encapsulados, pré-tratados com sacarose (0,5M) e PVS2, em processo de multiplicação em MS½ suplementado com fitagel 2%, após descongelamento.....	54
Figura 19-	Embriões somáticos encapsulados, pré-tratados com sacarose a 0,5M e PVS2 por 30 minutos e recuperados em MS suplementado com PIC 20µM, após o descongelamento.....	54
Figura 20-	Embriões somáticos não encapsulados, recuperados após desidratação em sacarose (0,3M) e exposição ao fluxo laminar por 5 min.....	56
Figura 21-	Embriões somáticos submetidos à desidratação prévia em sacarose a 0,7M e pelo fluxo laminar por 5 minutos e recuperados em meio MS0 suplementado com PIC 20µM	58

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 -	Origem e registro em herbário das populações <i>P. alliacea</i> L. coletadas em diferentes locais da região central do Rio de Janeiro, Brasil.....	30
Tabela 2 -	Frequência de formação de embriões somáticos de <i>Petiveria alliacea</i> L. primários a partir de explantes foliares das diferentes linhagens estudadas.....	38
Tabela 3 -	Efeito da pré-cultura em meio suplementado com diferentes concentrações de sacarose (24h) no teor hídrico dos embriões somáticos da linhagem AL após 60 dias de cultivo.....	44
Tabela 4 -	Sobrevivência de embriões somáticos de <i>Petiveria alliacea</i> L. submetidos ao tratamento com diferentes concentrações de sacarose e expostos por diferentes tempos na solução de PVS2 antes e após o congelamento em NL.....	46
Tabela 5 -	Sobrevivência de embriões somáticos de <i>Petiveria alliacea</i> L. submetidos ao tratamento com diferentes concentrações de sacarose e expostos por diferentes tempos na solução de PVS3, antes e após o congelamento em NL.....	47
Tabela 6 -	Frequência de recuperação de embriões somáticos de <i>Petiveria alliacea</i> L. submetida, ou não, ao congelamento em NL após tratamento com diferentes concentrações de sacarose e expostos por diferentes tempos de exposição ao PVS2, em meio de cultura semi-sólido MS $\frac{1}{2}$ suplementado com fitagel 2%, após 90 dias de cultivo.....	49
Tabela 7 -	Frequência de recuperação de embriões somáticos de <i>Petiveria alliacea</i> L. submetidos, ou não ao congelamento em NL após tratamento com diferentes concentrações de sacarose e expostos por diferentes tempos em solução de PVS3, em meio de cultura sólido MS $\frac{1}{2}$ suplementado com fitagel 2%, após 90 dias de cultivo.....	50
Tabela 8 -	Frequência de recuperação de embriões somáticos de <i>Petiveria alliacea</i> L. congelados ou não em NL após tratamento com diferentes concentrações de sacarose e PVS2 por 15 min, cultivados em meio líquido MS $\frac{1}{2}$ após 60 dias de cultivo.....	51
Tabela 9 -	Frequência de multiplicação de embriões somáticos de <i>Petiveria alliacea</i> L. submetidos ao tratamento com sacarose 0,5M e PVS2 por 15 min, em meio de cultura semi-sólido MS suplementado com PIC (20 μ M), suplementado com diferentes concentrações de BAP, após 60 dias decultivo.....	51

Tabela 10 -	Frequência de recuperação de embriões somáticos de <i>Petiveria alliacea</i> L. submetidos ao tratamento com sacarose 0,5M e PVS2 por 15 min, meio de cultura líquido MS suplementado com PIC (20µM) suplementado com diferentes concentrações de BAP, após 60 dias de cultivo.....	53
Tabela 11-	Criopreservação de embriões de <i>Petiveria alliacea</i> L. pré-tratados com sacarose 0,5M e PVS2 por diferentes períodos, encapsulados em alginato de cálcio e congelados em NL, após 60 dias de cultura em diferentes meios.....	55
Tabela 12 -	Frequência de recuperação de embriões somáticos de <i>Petiveria alliacea</i> L. após desidratação prévia em sacarose não-encapsulados e desidratação suplementar em fluxo laminar e cultivo em diferentes meios de cultura, após 60 dias de cultivo.....	57
Tabela 13 -	Efeito do pré-tratamento com diferentes concentrações de sacarose no conteúdo hídrico dos ápices caulinares de <i>Petiveria alliacea</i> L.....	59
Tabela 14 -	Efeito do pré-tratamento no conteúdo hídrico dos ápices caulinares de <i>Petiveria alliacea</i> L. submetidos à pré-cultura e tratamento com PVS2 em diferentes tempos de exposição.....	59
Tabela 15 -	Efeito do pré-tratamento no conteúdo hídrico dos ápices caulinares de <i>Petiveria alliacea</i> L. submetidos à pré-cultura e tratamento com PVS3 em diferentes tempos de exposição.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AIA	ácido 3-indolacético
ABA	ácido abscísico
AL	Linhagem embriogênica em cultura há 24 meses
BAP	6-benzilaminopurina
DDS	dibenzil dissulfeto
DMSO	dimetil sulfóxido
DTS	dibenzil trissulfeto
E.S	embriogênese somática
GCMS	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
MS	meio de cultura Murashige & Skoog
MS0	meio MS sem adição de reguladores de crescimento
MS ½	meio MS com a metade da concentração de sais
MG	Linhagem de Magé
NL	nitrogênio líquido
NT	Linhagem de Niterói
PIC	ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram)
PVS2	<i>Plant vitrification solution 2</i>
PVS3	<i>Plant vitrification solution 3</i>
PF	peso fresco
PS	peso seco
TH	teor hídrico
TTC	cloreto 2,3,5 trifenil tetrazólio
VI	Linhagem de Vila Isabel

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	18
1.1	Conservação de plantas medicinais	19
1.1.1	<u>Conservação <i>in vitro</i></u>	20
1.1.2	<u>Criopreservação</u>	23
1.1.2.1	Desidratação	24
1.1.2.2	Vitrificação.....	24
1.2	<i>Petiveria alliacea</i> L.	26
1.2.1	<u>Clasificación e distribución</u>	27
1.2.2	<u>Estudos Fitoquímicos e Farmacológicos</u>	27
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivo geral	29
2.2	Objetivos específicos	29
3	METODOLOGIA	30
3.1	Material Vegetal	30
3.2	Condições de cultura	30
3.3	Germinação <i>in vitro</i>	31
3.4	Cultura de tecidos vegetais	31
3.5	Criopreservação de Embriões Somáticos	32
3.6	Criopreservação de Ápices Caulinares	34
3.7	Análise Estatística	35
4	RESULTADOS	36
4.1	Germinação <i>in vitro</i>	36
4.2	Cultura de Tecidos Vegetais	37
4.3	Criopreservação de Embriões Somáticos	43
4.3.1	<u>Pré-cultura</u>	43
4.3.2	<u>Vitrificação</u>	45
4.3.3	<u>Encapsulamento/vitrificação</u>	53
4.3.4	<u>Encapsulamento/desidratação</u>	55
4.4	Criopreservação de Ápices Caulinares	58
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÕES	66
7	PERSPECTIVAS	68
	REFERÊNCIAS	69

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi realizado nos laboratórios do Núcleo de Biotecnologia Vegetal (Departamento de Biologia Vegetal e Departamento de Biologia Celular), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, e com o apoio financeiro da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de aperfeiçoamento pessoal de nível superior (CAPES).

INTRODUÇÃO

As espécies de plantas medicinais são assim consideradas por possuírem atividades farmacológicas que podem ser exploradas de diversas formas pelo homem, principalmente a de utilização direta como medicamento, para o tratamento ou prevenção de doenças, além de servirem também como fonte de matéria prima na produção de alimentos e outros produtos industrializados (FOGLIO et al., 2006). Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde), mais de 80% da população mundial depende das plantas medicinais como uma forma viável de acesso aos cuidados básicos da saúde, principalmente nos países em desenvolvimento. No Brasil, mais de 1.000 espécies de plantas medicinais são comercializadas em feiras livres e mercados populares, sendo frequentemente cultivadas, em pequena escala, em quintais residenciais (MACIEL *et al.*, 2002).

O difícil acesso de populações carentes a atendimento médico especializado, aliado à fácil obtenção desses materiais através de coleta e à tradição popular ao longo dos anos, contribuem para o aumento da utilização desses recursos (MACIEL *et al.*, 2002). Por essas razões, a prática de coletas não sustentáveis têm causado erosão genética importante em populações de muitas espécies amplamente distribuídas. Portanto, a implementação de estratégias visando à conservação dessas espécies é de grande importância, tanto do ponto de vista ecológico como econômico.

Do ponto de vista econômico, a utilização das plantas para a obtenção de novos fármacos foi definida pela OMS como: “Todo ou qualquer vegetal que possua, em um ou mais órgãos, substâncias que possam ser utilizadas para fins terapêuticos, ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos”. Esses fármacos vêm sendo amplamente utilizados como, por exemplo, a morfina, vincristina, colchicina e a rutina, entre outros (FILHO E ROSENDO, 1998).

Embora a indústria farmacêutica já tenha implantado a síntese química de vários metabólitos, essa prática pode ser limitada em função da complexidade molecular. Assim, a obtenção de novos fitofármacos exige, em muitos casos, a presença da planta completa, ou de seus órgãos. Nesse aspecto, a biotecnologia vegetal, através do cultivo *in vitro*, disponibiliza ferramentas eficientes que têm como base a clonagem das plantas através de diferentes vias regenerativas.

As técnicas de cultura de tecidos vegetais dependem de uma seleção prévia de explantes, que são inoculados, assepticamente, em frascos de vidro contendo meios de

cultura. Após um determinado período, sob condições de incubação padronizadas, obtém-se uma grande produção de plantas idênticas à matriz, e livres de qualquer tipo de contaminação. Nestas técnicas, é possível a manipulação de fatores que influenciam o metabolismo da planta, conseqüentemente afetando a qualidade e quantidade das substâncias químicas produzidas em condições de cultura.

Desta forma, muitos fármacos utilizados rotineiramente foram obtidos biotecnologicamente. DICOSMO E MISAWA (1995), observaram maior produção de metabólitos em *Catharanthus roseus* cultivada *in vitro* quando comparada com a produção no campo.

Pelo exposto, a literatura corrobora a grande importância da biotecnologia vegetal no desenvolvimento de novos fármacos, com destaque para a qualidade dos compostos químicos sintetizados por plantas mantidas *in vitro*. A formação de clones através da cultura de tecidos vegetais demonstra que cada célula vegetal em cultura possui toda a informação genética herdada da planta-mãe, sendo, portanto, capaz de produzir os compostos químicos encontrados naturalmente (RAO E RAVISHANKAU, 2002).

1.1 Conservação de Plantas Medicinais

Na prática, basicamente duas estratégias de conservação têm sido empregadas para espécies vegetais em geral: *in situ* e *ex situ*.

A conservação *in situ* visa principalmente à manutenção e recuperação de ecossistemas, habitats naturais e populações em seu meio natural. Este tipo de conservação é, normalmente, considerado ideal, pois propõe a conservação de espécies em seu ambiente de ocorrência natural, e como conseqüência, essas espécies sob ações seletivas naturais, conservam seu processo evolutivo, permitindo a manutenção da diversidade e do patrimônio genético. Entretanto, a utilização de métodos de conservação *in situ* é limitada quando se refere às plantas medicinais, uma vez que essas espécies, muitas vezes apresentam ampla distribuição, ocorrendo fora das áreas protegidas, mas em pequenas populações, sujeitas à erosão genética devido à exploração predatória e desastres naturais (ENGELMANN, 1991).

Espécies com grande importância medicinal representam um recurso econômico inestimável, portanto métodos alternativos *ex situ* têm sido bastante utilizados visando à conservação de germoplasma fora do seu habitat, tanto em função da biodiversidade quanto à da preservação dos recursos genéticos contidos em genótipos de interesse (ROUT, 2000).

Dentre esses métodos, os mais utilizados são as coleções de campo, através da manutenção de plantas vivas e/ou bancos de sementes, mantidos por instituições públicas ou privadas, com interesses ecológicos e/ou agronômicos. Entretanto, espécies de interesse medicinal não têm sido conservadas adequadamente, nem tão pouco produzidas agronomicamente, sendo, normalmente obtidas de pequenas hortas domésticas ou extraídas da natureza. Esse quadro reflete bem a necessidade de estabelecerem-se protocolos de conservação para esses recursos.

1.1.1 Conservação *in vitro*

Dentro de uma abordagem biotecnológica a conservação de materiais vegetais *ex situ* vem sendo realizada com sucesso, através de diversas técnicas de cultura de tecidos e criopreservação, apresentando algumas vantagens em relação à conservação *in situ*, no que concerne à conservação e produção em larga escala de genótipos de interesse, independentemente das condições climáticas (VILLALOBOS E ENGELMANN, 1995).

A conservação *in vitro* por meios de processos biotecnológicos constitui uma alternativa importante aos métodos convencionais de conservação de germoplasma vegetal *ex situ*. Na prática, o armazenamento *in vitro* possibilita a estocagem dos materiais botânicos em pequenos espaços, reduzindo os custos de manutenção, facilitando o intercâmbio do germoplasma, tanto de espécies nativas como de espécies exóticas para pesquisas e melhoramento (ENGELMANN, 1997). Os métodos de conservação *in vitro* são baseados na cultura de tecidos, podendo ser realizados por meio de crescimento contínuo, crescimento lento ou criopreservação.

A cultura de tecidos vegetais se baseia no crescimento de plantas, em um meio condicionado artificialmente, a partir de fragmentos (explantes) de tecidos ou órgãos isolados de uma planta matriz (GEORGE, 2008). A totipotência das células vegetais possibilita que a cultura de tecidos disponibilize vários sistemas para a produção de plantas completas, órgãos, calos e células *in vitro*. Dentre esses sistemas, a micropropagação permite a produção de clones a partir das plantas usadas como matrizes (BUNN *et al.*, 2007). Dependendo do objetivo a ser alcançado e da espécie estudada, a micropropagação pode ser conduzida por diferentes vias: 1) desenvolvimento ou multiplicação de meristemas pré-existentes 2) indução de gemas adventícias via organogênese e 3) embriogênese somática. (TORRES *et al.*, 1998)

O desenvolvimento de meristemas pré-existentes se caracteriza pela formação de partes aéreas, após a inoculação de tecido meristemático (ápices e gemas axilares) em meios básicos de cultura. A multiplicação de gemas pré-existentes pode ser obtida em resposta à presença de fitorreguladores, principalmente citocininas, no meio de cultura (TORRES *et al.*, 1998). O desenvolvimento dessas gemas origina brotos que, normalmente, requerem uma etapa de enraizamento para a formação de plantas completas, mas constituem as vias mais seguras do ponto de vista da estabilidade genética do material propagado (GEORGE, 2008).

Por outro lado, a indução de gemas adventícias, em locais onde não se desenvolveriam de forma natural, pode ocorrer diretamente na superfície do tecido, ou indiretamente, a partir de células desdiferenciadas que se multiplicam sob a forma de um calo (TORRES *et al.*, 1998).

Por fim, a embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas desdiferenciadas se rediferenciam dando origem a embriões, sem a fusão de gametas (TORRES *et al.*, 1998). Esse processo pode ter origem direta a partir de células competentes do explante, ou indireta, quando há formação de calo intermediário e apresenta algumas particularidades, analisadas a seguir.

Os embriões somáticos apresentam características morfogênicas semelhantes a embriões zigóticos com estrutura bipolar composta de ápice caulinar e radicular, além de apresentarem também os mesmos estádios de desenvolvimento: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. No entanto, diferem dos embriões zigóticos em alguns aspectos, pois não possuem tecido suspensor e endosperma, não formam tegumento, não entram em dormência e estão livres de correlações fisiológicas e físicas com o tecido que lhes deu origem (ZIMMERMANN, 1993).

Naturalmente a embriogênese somática ocorre de forma limitada no interior de óvulos, no entanto, nos últimos 40 anos métodos *in vitro* foram descritos e aperfeiçoados podendo ser aplicados a muitas espécies, uma vez definidos o explante, o meio de cultura e as condições ambientais adequadas (VON ARNOLD, 2008). Entretanto, o genótipo é o principal fator na definição do potencial para a embriogênese somática e o processo pelo qual as células somáticas adquirem competência embriogênica está relacionado à reprogramação e a expressão de genes em resposta às condições da cultura *in vitro* (FEHÉR *et al.*, 2005).

A cultura de tecidos pode ser conduzida através do crescimento contínuo, que consiste na manutenção através de subculturas por períodos curtos de tempo, de forma que as plantas não esgotem o meio, evitando-se possíveis estresses que possam causar alterações genéticas ou fisiológicas (VILLALOBOS E ENGELMANN, 1995). A necessidade de mão de obra

intensa e custo elevado, além da grande demanda de espaço físico para a manutenção das culturas, constituem as principais desvantagens deste método, ele revela-se interessante em função da possibilidade de se multiplicar substancialmente e rapidamente o germoplasma conservado, que permanece com disponibilidade imediata para utilização.

No crescimento lento, o objetivo é a estocagem do material vegetal por períodos maiores, com o aumento dos intervalos entre as subculturas de três a nove meses (VILLALOBOS E ENGELMANN, 1995), podendo chegar a dois anos sem subculturas em algumas espécies (BANERJEE E LANGHE, 1985; KARTHA *et al.*, 1981). A diminuição no crescimento das culturas pode ser obtida através da manipulação das condições físicas do ambiente (intensidade luminosa, temperatura) e dos componentes nutricionais que estão presentes nos meios de cultura (ENGELMANN, 2010). Outra alternativa é a adição de retardantes osmóticos (manitol, sorbitol, etc.) (SANTOS *et al.*, 2011), ou hormonais (ácido abscísico) no meio de cultura (ROCA *et al.* 1984) com a propriedade de diminuir o metabolismo e, conseqüentemente, o crescimento da planta.

Todavia, para o armazenamento *in vitro* em longo prazo, a criopreservação é considerada a única alternativa para o armazenamento de tecido vegetativo por longos períodos, sem manipulação. Embora esse tempo de estocagem seja teoricamente indeterminado, tem sido avaliado na ordem de 10 anos para algumas espécies (ENGELMANN, 2011 b). Esta técnica apresenta um baixo-custo e oferece maior segurança na manutenção da fidelidade genética do material devido ao bloqueio do metabolismo vegetal nas condições às quais o material é submetido (MAZUR, 1970; ENGELMANN, 2004).

1.1.2 Criopreservação

A criopreservação se constitui do armazenamento do material vegetal através da imersão em nitrogênio líquido à -196°C (ENGELMANN, 2010) ou em seus vapores (-150°C). Nessas temperaturas ultra-baixas, a divisão celular e as atividades metabólicas, são suspensas permitindo que o material seja estocado, sem alterações, por longos períodos de tempo (MAZUR, 1970). Portanto, esta metodologia é considerada a mais segura para a manutenção da estabilidade genética do material vegetal, assim conservado (VILLALOBOS E ENGELMANN, 1995).

A literatura mostra que as culturas de plantas medicinais conservadas em nitrogênio líquido normalmente retêm o potencial regenerativo e biossintético (BUTENKO *et al.*, 1984; BAJAJ, 1988; BENSON E HAMILL, 1991; AHUJA *et al.*, 2002; DIXTI-SHARMA *et al.*, 2005). Entretanto, durante o congelamento rápido pode ocorrer formação de cristais de gelo, potencialmente causadores de injúrias ou até a morte dos tecidos (SANTOS, 2000). Este fenômeno é causado pela presença de altos níveis de água intra e extra-celular, sendo facilmente observado em espécies sensíveis que apresentam intolerância ao congelamento (ENGELMANN, 2011 b). Portanto, a desidratação é considerada uma etapa de proteção fundamental para o sucesso da criopreservação e pode ser obtida através da dessecação pelo ar ou pelo aumento da pressão osmótica causada pela utilização de soluções concentradas de substâncias químicas com propriedades crioprotetoras (SANTOS, 2000). A maioria dos protocolos de criopreservação se inicia com a desidratação dos tecidos ao nível máximo que permita a sobrevivência e a recuperação do material.

Portanto, a criopreservação pode ser conduzida por diferentes técnicas, as quais se baseiam em pré-tratamentos que visam à desidratação protetora do tecido vegetal antes do congelamento. Os primeiros protocolos se baseavam no congelamento lento do material. Esta técnica, ideal para espécies de clima frio, que possuem tolerância natural para resistir às temperaturas baixas, depende da utilização de congeladores programáveis, cuja velocidade de diminuição da temperatura decresce de 1 a 10°C/hora, até -40°C, quando o material, assim desidratado pode ser imerso em nitrogênio líquido (SANTOS, 2000; ENGELMANN, 2011). Com o decaimento gradual da temperatura, a água presente dentro do compartimento celular é expulsa lentamente, induzindo a proteção da estrutura celular, através da produção natural pela célula, de substâncias que irão conferir resistência ao congelamento (FULLER *et al.*, 2004).

Técnicas mais recentes, discutidas nesse trabalho, baseiam-se no congelamento e descongelamento rápidos de tecidos, pela utilização de substâncias crioprotetoras que induzem à desidratação, e ao mesmo tempo, impedem a formação de cristais de gelo intra e extra-celulares.

1.1.2.1 Desidratação

O controle da quantidade de água presente dentro da célula e o movimento desta água, entre os meios intra e extracelulares, são fatores essenciais para a obtenção de um protocolo eficiente de criopreservação (MAZUR, 1970). Por esse motivo, antes de ser congelado, o material deve ser submetido a um processo de desidratação que pode ser física, obtida através de dessecação pelo ar, em câmara de fluxo laminar, ou sílica gel (CHMIELARZ *et al.*, 2011), ou por ação de crioprotetores capazes de provocar uma desidratação osmótica característica do processo de vitrificação, descrito abaixo. Esses métodos têm por objetivo a retirada máxima de água presente dentro do compartimento celular, tornando-o protegido contra a formação de cristais de gelo que poderiam ocorrer durante o processo de congelamento. A sobrevivência dos tecidos vegetais à criopreservação está extremamente relacionada à sua capacidade de tolerar a desidratação (SANTOS, 2000). Cada espécie apresenta um teor de água ideal para a sobrevivência ao congelamento e descongelamento (POPOVA *et al.*, 2010). Portanto, é de suma importância a avaliação da desidratação celular, pois indica se os componentes celulares se adaptam facilmente às condições de estresse osmótico (BHUSHAN *et al.*, 2011). Estudos anteriores revelam que plantas tropicais necessitam de tratamentos criogênicos específicos que promovam artificialmente a desidratação celular e induzam tolerância a temperaturas ultra-baixas, já que essas espécies, devido às suas origens, não desenvolvem esse tipo de tolerância naturalmente (ENGELMANN E TAKAGI, 2000; ARNAO *et al.*, 2008).

1.1.2.2 Vitrificação

É definida como um processo físico onde o conteúdo intracelular congela a temperaturas ultra-baixas, sob a ação de uma solução altamente concentrada de crioprotetores, sofrendo uma transição do estado líquido para o estado vítreo, meta-estável, sem a formação de cristais. Durante o congelamento, o conteúdo intracelular torna-se bastante concentrado devido à produção de vários solutos compatíveis, até o equilíbrio osmótico com o ambiente extracelular através da membrana plasmática. Esse ponto indica que o tecido está protegido contra a desidratação excessiva, pela manutenção do volume celular. O material assim congelado sofre um bloqueio metabólico e, a difusão molecular através de movimentos intra e extracelulares é interrompida, impedindo assim, a formação de cristais de gelo (ARMITAGE e RICH, 1990). Consequentemente, esse estado vitrificado explica a tolerância às altas taxas de resfriamento e aquecimento, e também a estabilidade celular durante o congelamento em

NL (ARMITAGE e RICH, 1990), uma vez que alterações físicas e químicas podem ser prevenidas durante o processo de desidratação (ARNAO *et al.*, 2008).

As técnicas de vitrificação foram desenvolvidas com base nesse processo natural, e foram obtidas por meio da desidratação dos tecidos por exposição artificial à soluções concentradas de crioprotetores químicos, durante o pré-tratamento (ENGELMANN, 2004). Atualmente, vêm sendo desenvolvidos diferentes protocolos de vitrificação variando-se a composição das soluções crioprotetoras, sendo as substâncias mais utilizadas: dimetilsulfóxido (DMSO), etileno glicol, glicerol e propileno glicol (SAKAI *et al.*, 2007). Os protocolos também variam em função do tempo de exposição e das etapas de crioproteção necessárias, dependendo das características fisiológicas de cada espécie. Essa técnica tem sido muito utilizada com espécies de clima tropical, categoria que reúne muitas espécies nativas, com potencial medicinal (OZUDOGU *et al.*, 2012; MA *et al.*, 2012; CHUA *et al.*, 2011; FANG *et al.*, 2011; SAJINI *et al.*, 2011).

Mais recentemente, foram desenvolvidas técnicas adaptativas como o encapsulamento/vitrificação ou encapsulamento/desidratação, onde o explante é envolvido por uma cápsula formada de alginato de sódio, geralmente antes de ser submetido aos procedimentos de desidratação. Estas técnicas permitem a utilização de concentrações mais altas de crioprotetores durante a pré-cultura, induzindo maior tolerância à desidratação, que poderia ser letal para o explante se não houvesse essa forma de proteção. A cápsula de alginato de sódio, além de conferir proteção, disponibiliza os nutrientes para o explante durante todas as etapas de pré-tratamentos (ENGELMANN, 2011 a).

1.2 *Petiveria alliacea* L.



Figura 1- *Petiveria alliacea* L., indivíduo da população de Niterói (NT).

Essa espécie é conhecida popularmente como guiné, erva-de-alho, erva-tipi ou amansa-senhor entre outros nomes (KUBEC, 2003) e tem sido tradicionalmente usada na medicina popular, devido a diversas atividades farmacológicas muitas já comprovadas cientificamente, como antiinflamatória, antimicrobiana, antitumoral, diurética, anestésica, entre outras (GOMES *et al.*, 2008; BLAINSKI *et al.*, 2010; URUEÑA, *et al.*, 2008; DUARTE, 2005). O extrato alcoólico é recomendado para uso externo no tratamento de paralisias e reumatismo, enquanto a raiz é usada contra dor de dente. Os efeitos neurológicos são conhecidos desde o tempo dos escravos, que misturavam as raízes pulverizadas ao alimento consumido por seus senhores, o que causava superexcitação, insônia, alucinações, convulsões e morte. Por essa razão as folhas são ainda hoje amplamente utilizadas em rituais religiosos, além de serem usadas em banhos e na produção de defumadores (CASTELLAR *et al.*, 2011).

1.2.1 Classificação e distribuição

Petiveria alliacea L. é uma dicotiledônea herbácea subarborescente, perene, pertencente à família Phytolaccaceae. A espécie se caracteriza por seus ramos eretos, folhas lisas, alternas, elípticas e minúsculas flores brancas em espigas terminais, além de forte odor alíáceo (PONTE *et al.* 1996; GOMES *et al.*, 2004).

Embora nativa da Região Amazônica, atualmente apresenta distribuição geográfica ampla, sendo encontrada desde a América Central, incluindo o Caribe, até a América do Sul, assim como em alguns países dos continentes Africano e Asiático com clima tropical. Pode ser encontrada em toda a extensão territorial do Brasil, com populações concentradas em regiões de floresta pluvial.

1.2.2 Estudos fitoquímicos e farmacológicos

Vários compostos químicos já foram caracterizados, com distribuição variada nas diferentes partes da planta. Alguns dos compostos encontrados, preferencialmente, nas raízes foram benzaldeído, dibenzildissulfeto, cis- e trans-stilbeno, dibenziltrissulfeto e cumarina (KUBEC, 2003; DE SOUZA, 1990). Nas folhas, foram identificados flavonóides como 6-C-formil e 6-C-hidroximetil, além de outros compostos como glicosídeos saponínicos, triterpenos, isoarborinol, isoarborinol acetato, isoarborinolcinamato, esteróides, alcalóides e tanino (DE SOUZA, 1990; DELLE-MONACHE, 1992, 1996). A ocorrência de vários polissulfetos nesta espécie, como: dibenziltrissulfeto (DTS), dibenzildissulfeto (DDS), benzilhidroximetil sulfeto e dibenziltritiometano foi relatada em 1990 (DE SOUZA, 1990). O DTS é o principal composto lipofílico de *P. alliacea*, tendo sido identificado como um componente imunomodulatório que também apresenta propriedades neurotóxicas e citostáticas (ROSNER *et al.* 2001). Portanto, a produção biotecnológica da espécie apresenta grande interesse devido à possibilidade de fornecer matéria prima para a indústria farmacêutica, já que a síntese química de algumas substâncias complexas, ainda não é possível industrialmente.

A cultura de tecidos de *Petiveria alliacea* L. foi estabelecida anteriormente através de diferentes estratégias que permitiram a produção de plantas via amplificação meristemática (CASTELLAR, 2006) e embriogênese somática (CANTELMO, 2011), além da calogênese e da cultura de células em suspensão (CASTELLAR *et al.*, 2011). Estudos fitoquímicos revelaram a presença de flavonóides e dimetildissulfeto DDS, um polissulfeto precursor de dimetiltrissulfeto (DTS) em diferentes extratos de folhas e raízes de plantas desta espécie, mantidas *in vitro* (SOARES, 2011). A presença de DTS já foi detectada, em extratos obtidos de embriões somáticos (WEBSTER *et al.*, 2008; CANTELMO, 2011), assim como de raízes de plantas convertidas e aclimatizadas (CANTELMO, 2011) .

A propagação vegetativa *in vitro*, através das diferentes vias possíveis, constitui uma ferramenta interessante para a produção de novos indivíduos, porém, fatores causadores de estresses, inerentes à cultura, como picos de temperatura, salinidade variável e utilização de reguladores de crescimento podem ocasionar alterações genéticas denominadas variações somaclonais (SCOWCROFT, 1981; CASSELLS e CURRY, 2001). Essas variações constituem o principal contratempo tanto para a conservação *in vitro* de germoplasma vegetal, quanto para a produção biotecnológica de metabólitos através da cultura. Por essa razão, os protocolos desenvolvidos devem evitar ou minimizar o aparecimento de variações e assim, dentre as técnicas disponíveis atualmente, a criopreservação é considerada a técnica mais segura, do ponto de vista genético, para a conservação *in vitro*.

Com base no exposto, a produção biotecnológica e a conservação de plantas medicinais, assim como de sistemas de produção de metabólitos representam um avanço tecnológico com reflexos importantes na indústria fitoquímica e na economia do país.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral, o estabelecimento de métodos de conservação *in vitro* de germoplasma de *Petiveria alliacea*, através da cultura de tecidos vegetais e criopreservação.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1. Estabelecer a embriogênese somática para diferentes linhagens estudadas, a partir de folhas de plantas *in vitro*.

2.2.2. Conservar *in vitro* plantas matrizes coletadas em diferentes populações, através do desenvolvimento meristemático, multiplicação meristemática e embriogênese somática.

2.2.3. Avaliar métodos de criopreservação (vitrificação, encapsulamento/vitrificação e encapsulamento/desidratação) em embriões somáticos visando à aplicação a genótipos de interesse.

3 METODOLOGIA

3.1 Material Vegetal

Plantas envasadas e mantidas no Telado do Núcleo de Biotecnologia Vegetal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro foram usadas como matrizes. Essas plantas foram coletadas em populações localizadas em diferentes regiões do RJ (Marechal Hermes, Niterói, Magé), assim como a partir do Horto Botânico da UERJ (Vila Isabel), tendo sido caracterizadas recentemente (SOARES *et al.* 2012). (Quadro 1).

Quadro 1 - Origem e registro em herbário das populações *P. alliacea* L. coletadas em diferentes locais da região central do estado do Rio de Janeiro, Brasil

Origem	Código	Localização	Registro HRJ
Magé	MG	22°64'32.18"S e 43°12'22.26"O elev 13 m	11.131
Marechal Hermes	MH	22°51'24.46"Se43°22'13.75"O elev 17 m	11.711
Niterói	NT	22°53'55.95"S e 43°05'09.37"O elev 54 m	11.710
Vila Isabel	VI	22°54'57.57"S e 43°14'18.54"O elev 22m	11.618
Planta envasada	AL	Linhagem embriogênica em cultura há 24 meses (Núcleo de Biotecnologia Vegetal)	10.371

3.2 Condições de cultura

As culturas foram mantidas à temperatura de $30^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa média de $46 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo branca fria.

3.3 Germinação *in vitro*

Amostras de sementes das plantas matrizes das respectivas populações foram submetidas à descontaminação através de uma sequência definida: (i) lavagem inicial com detergente em água corrente; (ii) tratamento com álcool 70% por 2 minutos; (iii) hipoclorito 0,5% por 2 minutos e (iv) Tween 1% e Benlate® a 1% por 15 minutos; (v) Agrimicina® a 1% por 15 minutos (SOARES, 2011).

A seguir, as sementes foram manipuladas assepticamente, em fluxo laminar, onde foram submetidas à lavagem com água esterilizada, sendo então inoculadas em diferentes meios de cultura: (i) MS sem adição de reguladores de crescimento (MS0), (ii) MS suplementado com Benlate® 0,04 g/L e Agrimicina® 300 mg/L e (iii) MS suplementado com AIA 0,6 μM . Foram utilizadas amostras de 10 sementes e os experimentos foram repetidos três vezes, para a determinação da porcentagem de germinação de cada população estudada.

3.4 Cultura de Tecidos Vegetais

As plantas derivadas da germinação *in vitro* foram utilizadas como doadoras de diferentes explantes para a micropropagação de plantas *in vitro* a partir das diferentes populações estudadas. Amostras de ápices caulinares, segmentos nodais excisados dessas plantas foram inoculados em meio MS0 visando a produção e multiplicação de plantas por via meristemática (SOARES, 2010). Além disso, folhas das plantas das diferentes culturas obtidas foram utilizadas para a indução e o estabelecimento da embriogênese somática. As plantas assim obtidas foram usadas como doadoras de ápices caulinares para criopreservação, e de folhas para indução embriogênica.

Amostras das folhas das mesmas plantas foram inoculadas em MS suplementado com PIC (20,0 μM) ou 2,4D (22,6 μM) visando à produção de embriões somáticos com base em protocolo definido anteriormente (CANTELMO, 2011). Após 60 dias de incubação a $30\pm 2^\circ\text{C}$ em câmara de crescimento sob intensidade luminosa de $46\ \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, as culturas foram avaliadas pela frequência de regeneração dos explantes (folhas) e pelo número de embriões por explante. Os embriões foram retirados do explante foliar e mantidos em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ suplementado com fitagel (2%). A avaliação da multiplicação desses embriões das linhagens de NT e MH foi realizada após 30, 60, 90 e 120 dias, aqueles da linhagem VI foram avaliados em até 60 dias.

3.5 Criopreservação de Embriões Somáticos

Experimentos de criopreservação de embriões somáticos foram padronizados com a linhagem AL, e foram utilizados embriões excisados diretamente a partir do tecido foliar.

Pré-cultura: embriões somáticos foram mantidos em meio MS $\frac{1}{2}$ suplementado com fitagel (2%) por sete dias antes dos tratamentos. A seguir foram pré-cultivados em meio MS $\frac{1}{2}$ suplementado com diferentes concentrações de sacarose (0,3, 0,5 e 0,7M) por 24h. Os experimentos foram realizados com amostras de cinco embriões e avaliados pela taxa de desidratação calculada com base no teor hídrico (T.H.) após cada tratamento. O T.H foi calculado segundo a fórmula (WENG *et al.*, 2011):

$$\text{T.H.} = \frac{(\text{PF}-\text{PS}) \times 100}{\text{PF}}$$

Onde: PF = peso fresco e PS=peso seco

Vitrificação: Na etapa seguinte, os embriões foram distribuídos em criotubos e tratados com PVS2 (sacarose a 0,4M, glicerol a 30%, etileno glicol a 15% e DMSO a 15%) (SAKAI *et al.*, 1990) e PVS3 (glicerol a 50% + sacarose a 50%) (Nishizawa *et al.*, 1993) por diferentes períodos de tempo (0, 15, 30, 45 ou 60 minutos). A seguir, a solução crioprotetora foi removida e, substituída por 1 mL dessa mesma solução fresca, antes da imersão em NL. Após o congelamento por 24h, criotubos contendo os embriões somáticos foram descongelados rapidamente, em banho-maria a 40°C por um minuto. Em seguida, a solução crioprotetora foi substituída por meio MS $\frac{1}{2}$ suplementado com sacarose a 1,2M por 5 minutos, sendo esse meio diluído gradativamente pela substituição por meio MS $\frac{1}{2}$ líquido e em seguida, os explantes foram mantidos no escuro até o início de sua recuperação. Para a recuperação e multiplicação dos embriões, foram testados diferentes meios de recuperação (semi-sólido e líquido): MS $\frac{1}{2}$ + fitagel (a 2%), ou MS suplementado com diferentes concentrações de BAP (4,44 ; 13,32 e 22,19 μ M), em combinação com PIC (20 μ M). Já a avaliação da recuperação de embriões submetidos ao tratamento com crioprotetor PVS3, foi testado somente o meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ suplementado com fitagel 2%.

As taxas de sobrevivência foram avaliadas através do teste com TTC em cada etapa do tratamento, antes e após o congelamento em NL e a regeneração foi avaliada após 60 dias de cultivo nos diferentes meios de recuperação. Em todos os experimentos foram utilizados 5-10 explantes por tratamento e cada experimento foi repetido pelo menos três vezes.

Teste colorimétrico do Trifenil Tetrazólio (TTC): Os embriões foram imersos em 1mL da solução de TTC e, em seguida submetidos a vácuo por dez minutos e incubados a uma temperatura de 28°C. Após uma hora de incubação, a percentagem de sobrevivência foi avaliada pela observação visual de alteração na coloração dos embriões (MIKULA, *et al.* 2006). Nesse experimento, foram utilizadas amostras de cinco embriões submetidas a cada tratamento.

Encapsulamento/vitrificação: após os tratamentos de desidratação descritos acima, os embriões somáticos foram imersos em meio MS líquido suplementado com alginato de sódio a 3%. A solução contendo os embriões ou ápices foi gotejada em uma solução de MS suplementada com cloreto de cálcio a 0,1M. Após a polimerização completa (15-30 min), a 28°C sob agitação (100 rpm), as cápsulas formadas foram desidratadas em PVS2, por diferentes períodos de tempo, sendo então imersas em NL. O descongelamento e a recuperação do material seguiram o mesmo procedimento da vitrificação. Para a recuperação desse material, foram utilizados meios de cultura semi-sólido MS $\frac{1}{2}$ + fitagel e MS

suplementado com PIC (20 μ M). Todos os experimentos de criopreservação foram repetidos pelo menos três vezes com cinco explantes para cada tratamento.

Encapsulamento/desidratação: Neste experimento, os embriões somáticos após passarem pelo pré-tratamento de desidratação em diferentes concentrações de sacarose, foram, encapsulados ou não, em alginato de cálcio, como descrito acima, e colocados sobre papel filtro, em placas de petri. Em seguida, foram expostos à desidratação em fluxo laminar por diferentes períodos de tempo (5,10 e15 minutos). A seguir, os embriões foram colocados em criotubos (2mL) e imersos em nitrogênio líquido por 24h (POPOVA *et al.*, 2010). Após o congelamento, foram avaliados os meios de recuperação MS ½ + fitagel e MS suplementado com PIC (20 μ m). A avaliação da sobrevivência foi feita da mesma forma descrita no item acima.

Após cada pré-tratamento, cerca de cinco embriões foram inoculados no meio de conversão (MS ½, suplementado com fitagel a 2%), para a obtenção de um controle.

3.6 Criopreservação de Ápices Caulinares

Para esses experimentos, foram utilizados os explantes excisados de plantas das linhagens: AL e NT.

Para a pré-cultura, os ápices caulinares, com cerca de 1 cm de comprimento, excisados de plantas obtidas *in vitro*, foram inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de sacarose (0,3 – 0,5 – 0,7M) por 24h. Os experimentos foram realizados com uma amostra de quatro explantes por tratamento e a avaliação da desidratação e a taxa do teor hídrico foi obtida seguindo o mesmo protocolo descrito na pré-cultura de embriões somáticos.

Na etapa de vitrificação, os ápices caulinares de plantas *in vitro* das linhagens AL e NT, após submetidos a pré-cultura em sacarose, foram então expostos, às soluções crioprotetoras (PVS2 ou PVS3), por períodos de tempo de 0, 30 ou 60 minutos, e imersos em NL. O descongelamento foi realizado rapidamente, conforme descrito anteriormente. Após o descongelamento e a retirada das soluções crioprotetoras, os explantes da linhagem AL foram inoculados em meio MS0 e explantes oriundos da linhagem de NT, em meio MS suplementado com BAP (22,19 μ M). Todas as culturas foram incubadas em câmara de crescimento, no escuro até o início de sua regeneração e, em seguida, foram transferidos para intensidade luminosa de 46 μ mol.m⁻².s⁻¹a 30 \pm 2 °C. A transferência desse material foi

realizada na presença da luz verde. A recuperação foi avaliada através da regeneração dos ápices após 30 dias de cultivo.

3.7 Análise Estatística

Os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes, utilizando-se grupos de 5 explantes. A avaliação estatística dos dados experimentais foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e do teste de comparações múltiplas, com o auxílio do programa Graphpad InStat. Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$, tendo sido adotado um intervalo de confiança de 95%.

4 RESULTADOS

4.1 Germinação *in vitro*

As sementes das populações estudadas (MG-MH-NT-VI) foram descontaminadas com sucesso em 80% das amostras. Após uma semana de cultivo foi possível observar o desenvolvimento de raízes em sementes inoculadas em meio de cultura suplementado com AIA a 0,6 μM . Em relação às sementes da população NT, o desenvolvimento da parte aérea era visível, após duas semanas, e em três semanas as plantas já atingiam 3 cm de comprimento (Figura 2).

Foi obtida uma taxa de germinação de 90-100% considerando-se todas as populações e todos os meios testados, sendo que as plantas germinadas em meio de cultura suplementado com AIA 0,6 μM alongaram mais rapidamente, mostrando-se mais desenvolvidas ao final de 30 dias de cultura (Figura 3).

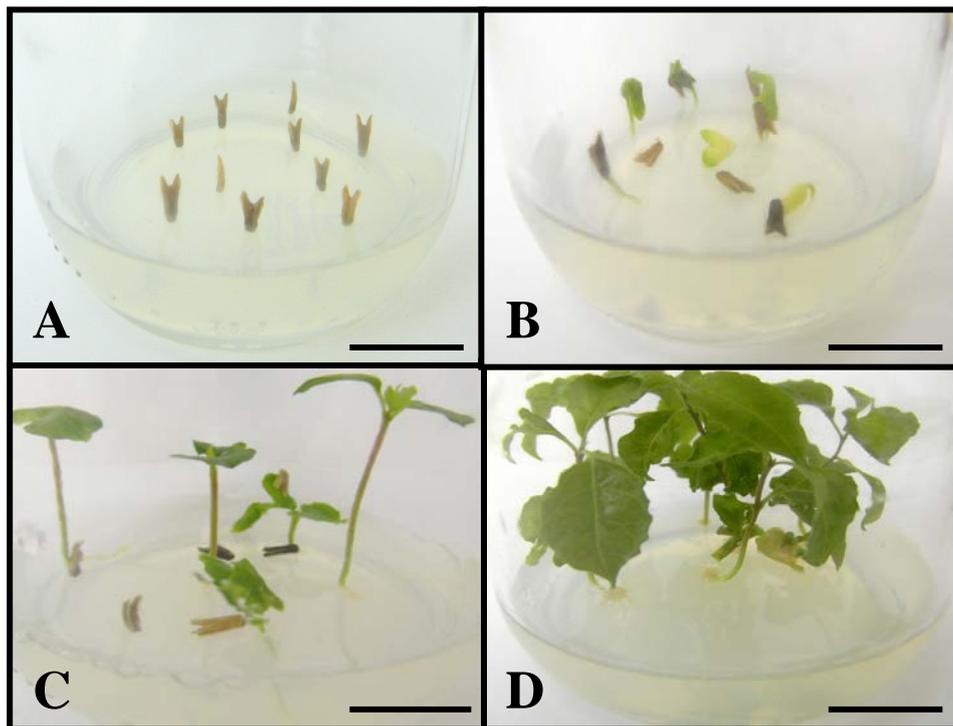


Figura 2 - Processo germinativo de sementes de *P.alliacea* L. (NT) em MS suplementado com AIA a 0,6 μM .

Legenda: A) sementes após inoculação; B) emergência da radícula após 1 semana de cultivo; C) Partes aéreas após 2 semanas de cultivo; D) plântulas após 3 semanas de cultivo. Barra = 1cm

Foto: Bianka de Oliveira Soares

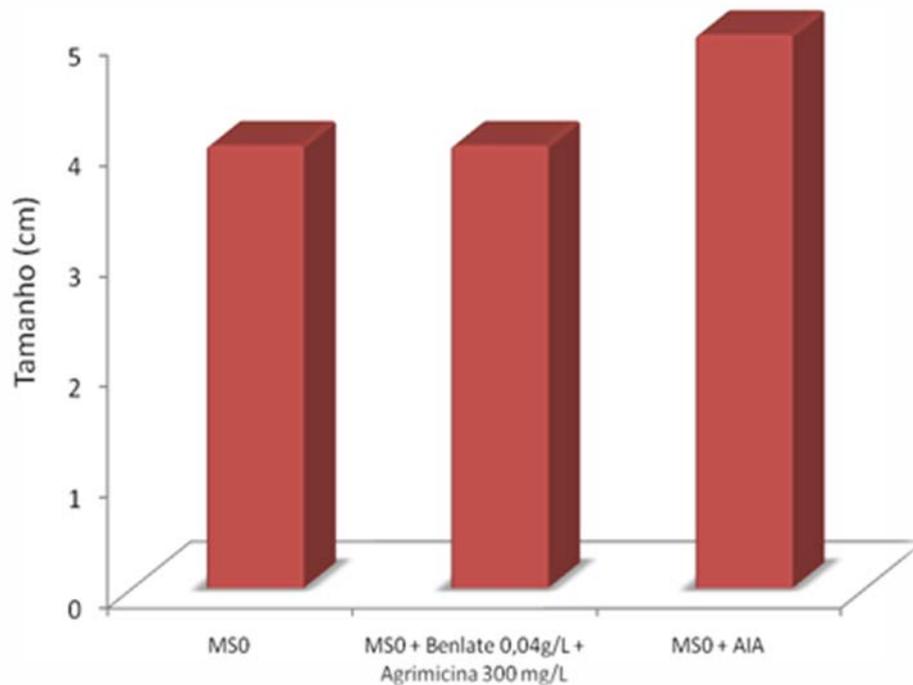


Figura 3 - Desenvolvimento das plântulas de *Petiveria alliacea* L. oriúnda do processo de germinação *in vitro* em diferentes meios de cultura após 30 dias de cultivo.

4.2 Cultura de Tecidos Vegetais

Multiplicação meristemática: as plantas de todas as populações estudadas foram propagadas a partir de explantes de ápices caulinares e segmentos nodais das plantas germinadas *in vitro*, com frequências de 100%. Estas plantas vêm sendo subcultivadas mensalmente, perfazendo atualmente cerca de 72, 157, 83,123 e 292 plantas completas das linhagens MH, MG, NT, VI e AL respectivamente.

Embriogênese somática: as culturas de segmentos foliares em presença de PIC (20 μ M) ou 2,4D (22,6 μ M) foram avaliadas semanalmente e após 60 dias de cultivo, foi possível observar a proliferação direta de embriões somáticos (Figuras 4 e 5), reproduzindo-se os resultados obtidos anteriormente com linhagem AL (CANTELMO, 2011). O melhor resultado para a cultura de embriões das linhagens AL, VI, MH e NT com uma taxa de 100% de regeneração, foi obtido em meio MS suplementado com PIC (20 μ M) (Tabela 2). Entretanto, em cultura de explantes foliares mantidos em meio MS suplementado com 2,4 D (22,6 μ M), também foi observada a formação de raízes além de um pequeno número de embriões somáticos nas folhas das plantas de três populações utilizadas (VI, NT, MG) (Figura 5).

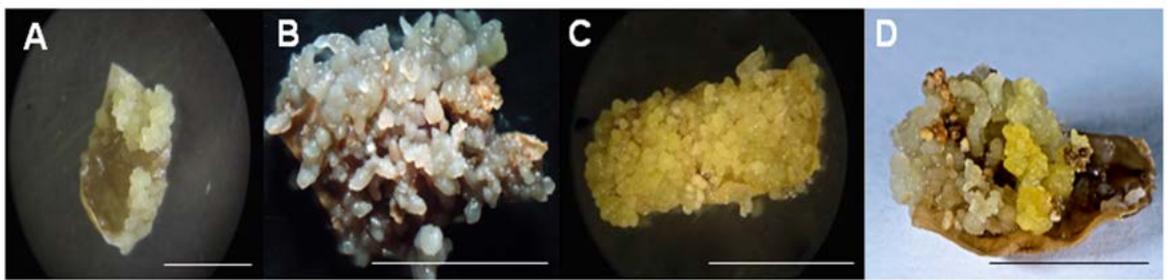


Figura 4 - Proliferação de embriões somáticos diretamente a partir de explantes foliares de *Petiveria alliacea* L. cultivados em meio MS suplementado com PIC (20,0 μ M), após 60 dias de cultura.

Legenda: A) Linhagem AL (AL); B) linhagem VI; C) linhagem NT; D) linhagem MH. Barra = 1cm

Tabela 2 - Frequência de formação de embriões somáticos de *Petiveria alliacea* L. primários a partir de explantes foliares das diferentes linhagens estudadas.

Origem das matrizes	Frequência de formação de embriões (%)	
	PIC (20 μ M)	2,4D (22,6 μ M)
VI	100	40
MG	0	50
NT	100	0
MH	100	0

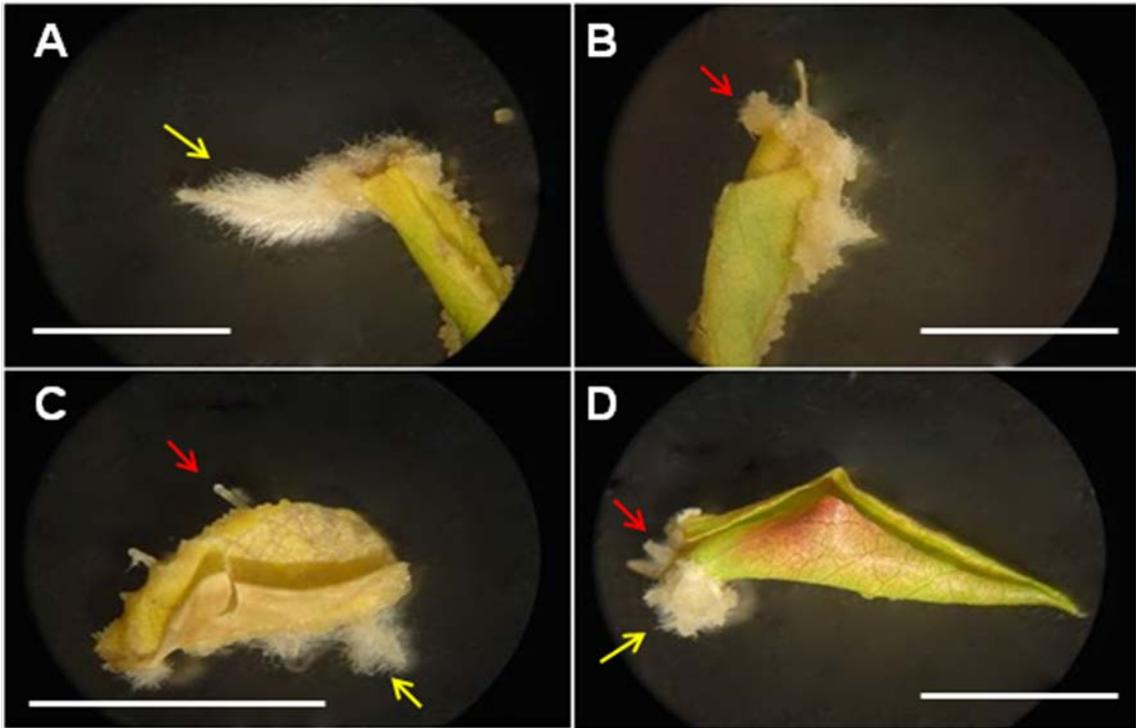


Figura 5 - Explantes foliares de *Petiveria alliacea* L. cultivados em meio MS suplementado com 2,4D (22,6 μ M), após 60 dias de cultivo.

Legenda: A) Formação de raízes (VI) seta amarela; B) Formação de embriões (VI) seta vermelha; C) linhagem NT; D) linhagem MG. Barra = 1cm.

Foto: Liane Peixoto Rocha

Para o acompanhamento da taxa de multiplicação embriogênica, os experimentos de indução a partir de folhas mantidas em MS suplementado com PIC (20 μ M) foram repetidos com as linhagens NT, MH e VI. Após 60 dias de cultivo, os embriões foram retirados da superfície foliar e inoculados em meio de cultura MS^{1/2} suplementado com fitagel 2%. O maior número de embriões por folha (cerca de 213) foi obtido com a linhagem MH (Figura6).

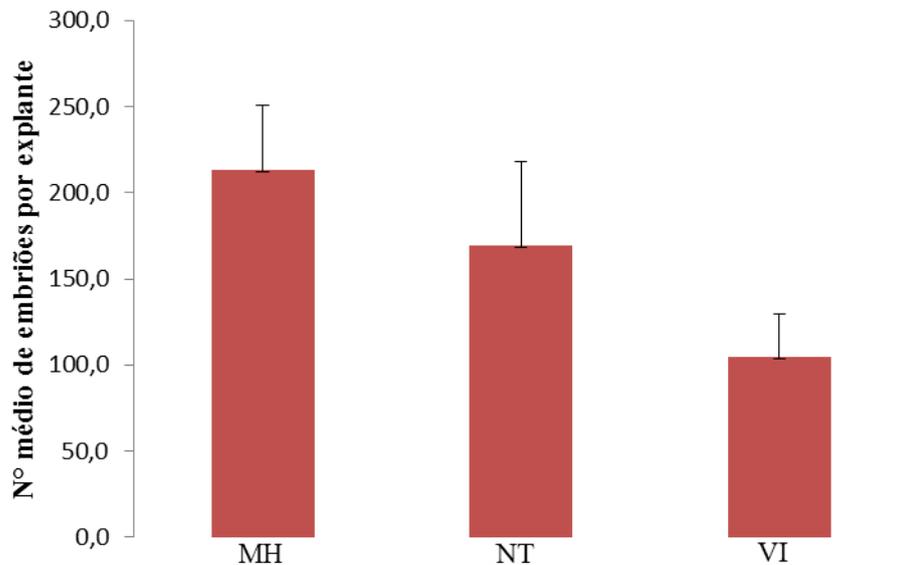


Figura 6 - Número de embriões por explante oriundos das diferentes linhagens estudadas, mantidas em meio MS suplementado com PIC (20 μ M), após 60 dias de cultivo.

A contagem dos embriões foi realizada mensalmente após 30, 60, 90 e 120 dias em NT e MH. Durante o andamento do experimento, foi possível observar uma multiplicação crescente dos embriões da linhagem NT por 120 dias (Figura 7), enquanto os embriões de MH (Figura 8) e VI (Figura 9) apresentaram um decaimento na sua multiplicação após 30 dias de cultura. Além disso, embriões das linhagens MH e VI apresentaram somente a forma globular durante o período de acompanhamento das culturas. A linhagem VI, foi acompanhada apenas até 60 dias de cultivo, devido à resposta mais lenta da cultura.

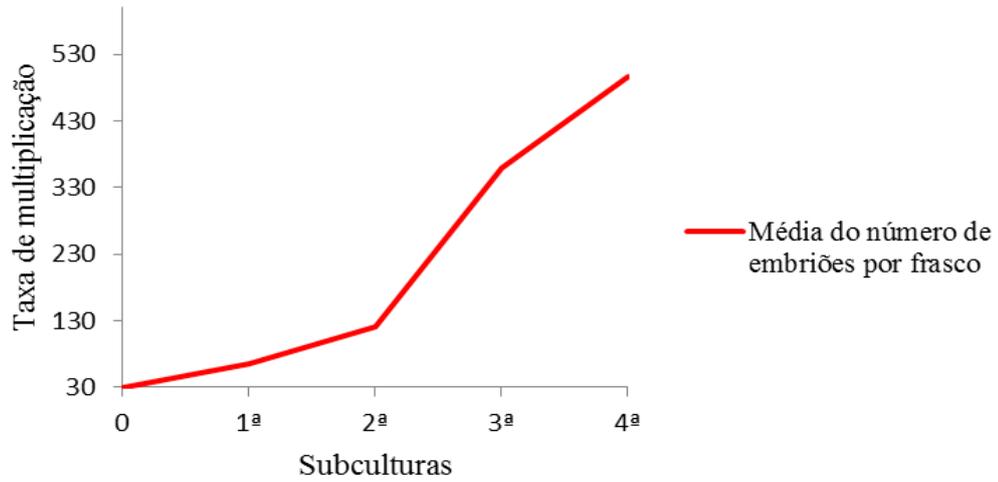


Figura 7 - Acompanhamento da taxa de multiplicação de embriões somáticos da linhagem NT até 120 dias. Os valores dos desvios padrão não ultrapassaram a 15% dos valores médios.

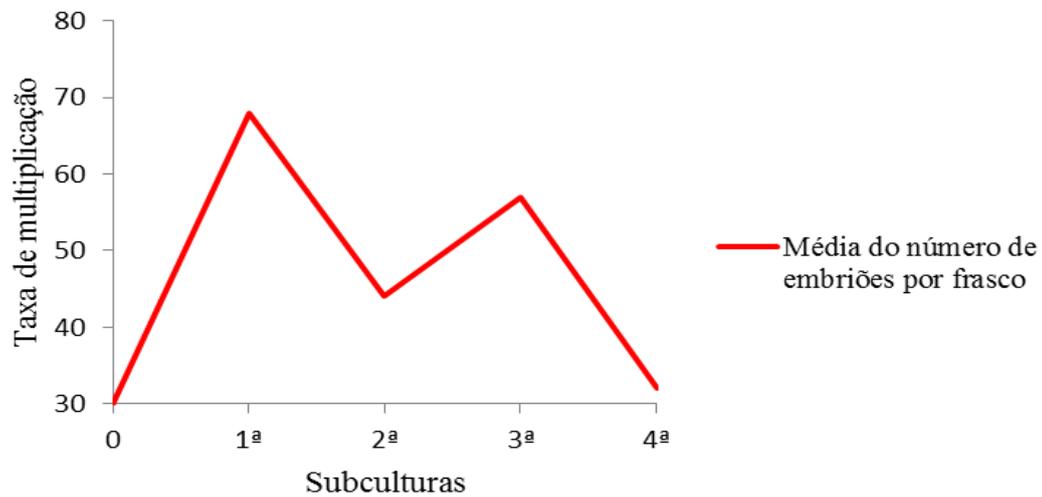


Figura 8 - Acompanhamento da taxa de multiplicação de embriões somáticos da linhagem MH até 120 dias. Os valores dos desvios padrão não ultrapassaram a 15% dos valores médios.

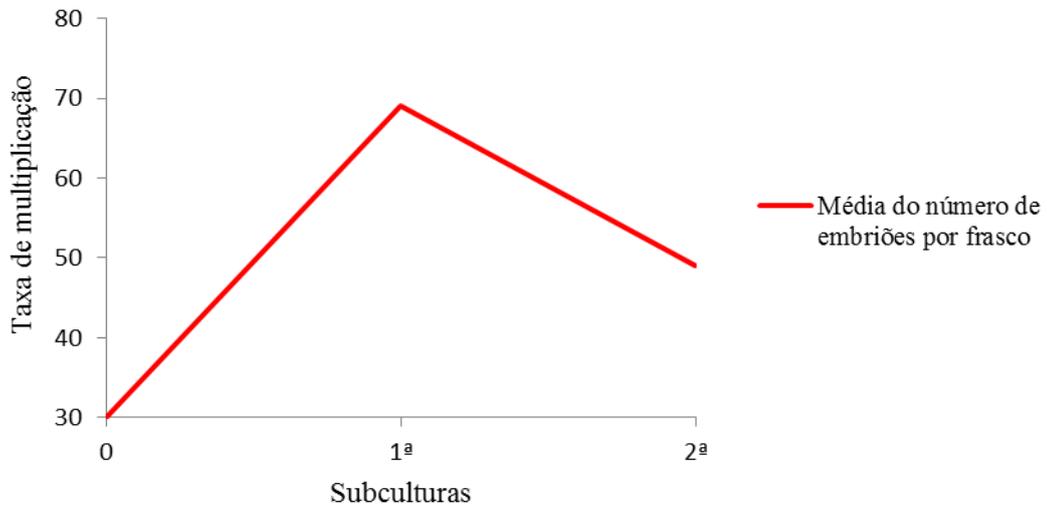


Figura 9 - Acompanhamento da taxa de multiplicação de embriões somáticos da linhagem VI até 60 dias. Os valores dos desvios padrão não ultrapassaram a 15% dos valores médios.

O processo de início de conversão à plantas só foi observado nos embriões somáticos da linhagem NT após 90 dias de cultivo em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ + fitagel (2%), esses embriões apresentaram também após este período de cultivo, diferentes pigmentações, entre elas, uma coloração avermelhada, indicando possivelmente a presença de antocianina (Figura 10-B).



Figura 10 - Início de conversão dos embriões somáticos de *Petiveria alliacea* L. a plantas em meio MS $\frac{1}{2}$ suplementado com fitagel 2%.

Legenda: (A) Linhagem VI após 60 dias, (B) linhagem NT após 120 dias – seta vermelha: pigmentação avermelhada, seta amarela – início de conversão, (C) linhagem MH após 90 dias de cultivo. Barra = 1mm.

Foto: Dr. Antônio Carlos Freitas

Os experimentos foram realizados com embriões induzidos a partir de folhas de plantas *in vitro*, de origem embriogênica, mantidas em cultura por 12 meses (linhagem AL). Após os tratamentos com diferentes concentrações de sacarose (0,3- 0,5 e 0,7M), os embriões sofreram uma desidratação proporcional ao aumento da concentração de sacarose, atingindo 24% na maior concentração testada (Tabela 3). O teste do TTC indicou a sobrevivência dos embriões quando tratados por diferentes concentrações de sacarose (Figura 11).



Figura 11 - Embriões somáticos de *Petiveria alliacea* L. tratados em diferentes concentrações de sacarose e submetidos ao teste colorimétrico TTC.

Legenda: (A) Controle, (B) 0,3M, (C) 0,5M e (D) 0,7M. (10x)

Tabela 3. Efeito da pré-cultura em meio suplementado com diferentes concentrações de sacarose (24h) no teor hídrico dos embriões somáticos da linhagem AL após 60 dias de cultivo.

Concentração de Sacarose (M)	Teor hídrico (%)	Frequência de multiplicação Após 60 dias (%)
0	91	100
0,3	79	85
0,5	75	100
0,7	67	80

Embriões somáticos tratados apenas com a sacarose em diferentes concentrações, mantiveram sua capacidade multiplicativa em cultura em meio MS $\frac{1}{2}$ suplementado com fitigel 2%, ao longo de subculturas mensais (até 60 dias) (Figura 12). Foi possível observar a presença de raízes em embriões tratados com 0,3 e 0,7M de sacarose (Figura 12A e E), enquanto que os embriões tratados com sacarose a 0,5M apresentaram diferentes estágios de desenvolvimento além do início de conversão a planta (Figura 12B, C e D).

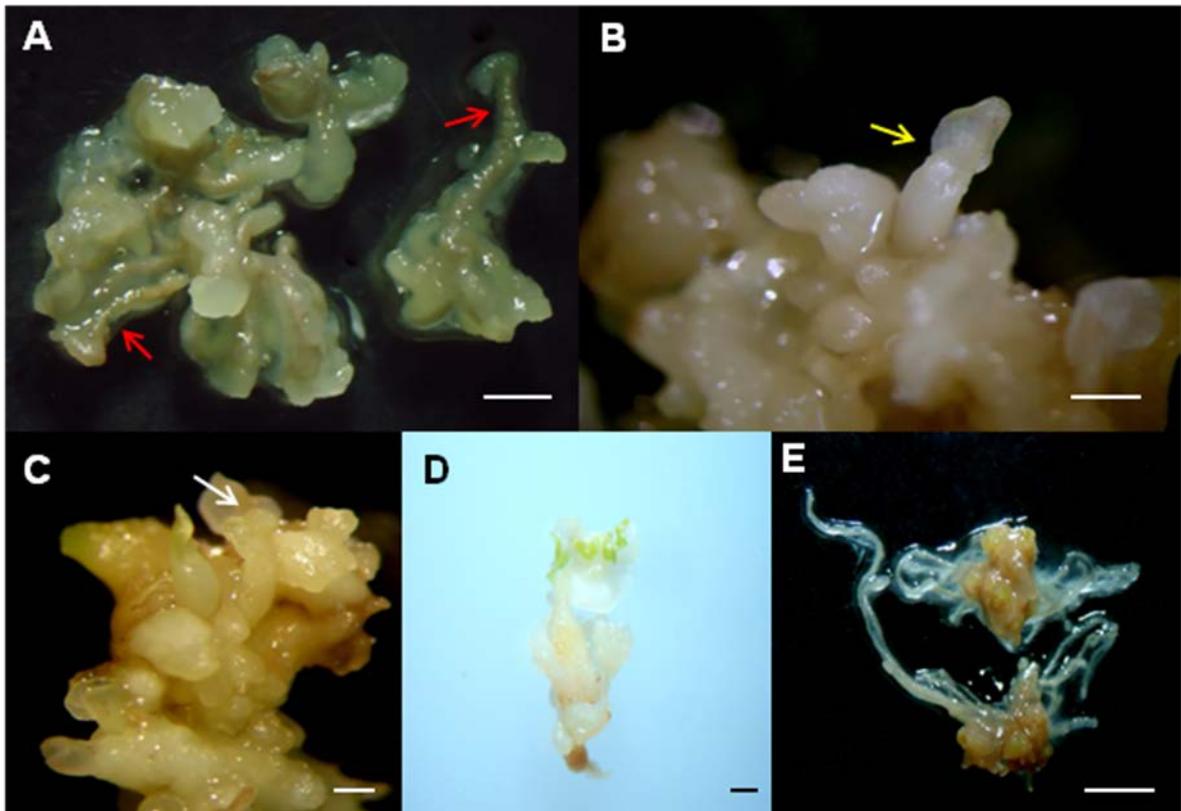


Figura 12 - Embriões somáticos desidratados por sacarose em diferentes concentrações, após 60 dias de cultivo em meio MS $\frac{1}{2}$ suplementado com fitigel 2%.

Legenda: (A) formação de raízes em 0,3M (seta vermelha); (B) 0,5M- embrião na fase torpedo (seta amarela) ; (C) 0,5M- cotiledonar (seta branca); (D) 0,5M- início da conversão; (E) 0,7M- raízes. Barra = 1mm.

Foto: Bianka de Oliveira Soares

4.3.2 Vitrificação

Após a desidratação causada pelo tratamento em sacarose, os embriões foram expostos por diferentes períodos (0,15,30,45 ou 60 minutos) às soluções crioprotetoras PVS2 e PVS3. Após vitrificação em PVS2, foram observadas taxas de sobrevivência pelo TTC de 100%, nos menores tempos de exposição (15 minutos), em embriões tratados com todas as concentrações de sacarose (Figura 13), enquanto que exposições mais demoradas inviabilizaram totalmente os explantes (Tabela 4). A vitrificação com PVS3 também possibilitou sobrevivência de 100% em embriões tratados com todas as concentrações de sacarose testadas, nos tempos de 15 e 30 minutos de exposição (Tabela 5) (Figura 14), indicando que, além da desidratação em sacarose, a solução de vitrificação também afetou a sobrevivência.

Os embriões controle, não congelados em NL, tratados com a sacarose e as soluções de vitrificação, em diferentes tempos de exposição, mantiveram sua capacidade multiplicativa em cultura em MS $\frac{1}{2}$ suplementado com Fitagel 2%, através de subculturas mensais (Figura 15).

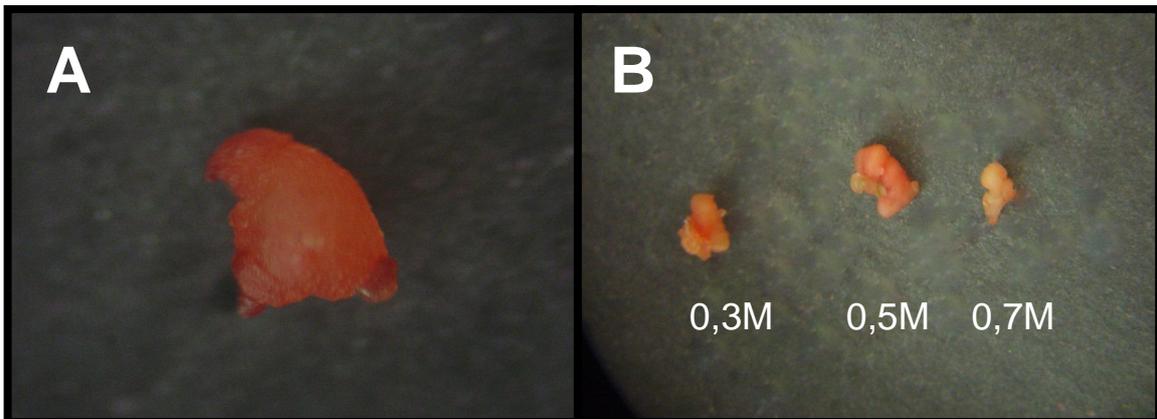


Figura 13 - Efeito da pré-cultura em meio contendo diferentes concentrações de sacarose na viabilidade de embriões somáticos submetidos ao PVS2 por 15 min determinado pelo TTC.

Legenda: (A) Controle sem a pré-cultura (30x); (B) Embriões submetidos a diferentes concentrações de sacarose (10x).

Tabela 4 - Sobrevivência de embriões somáticos de *Petiveria alliacea* L. submetidos ao tratamento com diferentes concentrações de sacarose e expostos por diferentes tempos na solução de PVS2 antes e após o congelamento em NL.

Pré-cultura em sacarose (24h)	PVS2 (min)	Teor Hídrico (%)	Sobrevivência pelo TTC (%)	
			-NL	+NL
0,3M	15	45	100	100
	30	60	0	0
	45	42	0	0
	60	11	0	0
0,5M	15	45	100	100
	30	52	0	0
	45	33	0	0
	60	14	0	0
0,7M	15	61	100	100
	30	63	0	0
	45	38	0	0
	60	9	0	0

Tabela 5 - Sobrevivência de embriões somáticos de *Petiveria alliacea* L. submetidos ao tratamento com diferentes concentrações de sacarose e expostos por diferentes tempos na solução de PVS3, antes e após o congelamento em NL.

Pré-cultura em sacarose (24h)	PVS3 (min.)	Teor Hídrico (%)	Sobrevivência pelo TTC (%)	
			-NL	+NL
0,3M	15	37	100	100
	30	32	100	100
	45	30	0	0
	60	59	0	0
0,5M	15	38	100	100
	30	11	100	100
	45	31	0	0
	60	0	0	0
0,7M	15	38	100	100
	30	35	100	100
	45	15	0	0
	60	20	0	0



Figura 14 - Efeito da pré-cultura em meio contendo diferentes concentrações de sacarose na viabilidade de embriões somáticos submetidos ao PVS3 por 15 min, determinado pelo TTC. Legenda: (A) Controle sem a pré-cultura (20x); (B) Explantes expostos por 15 min e (C) Explantes expostos por 30 minutos (10x).

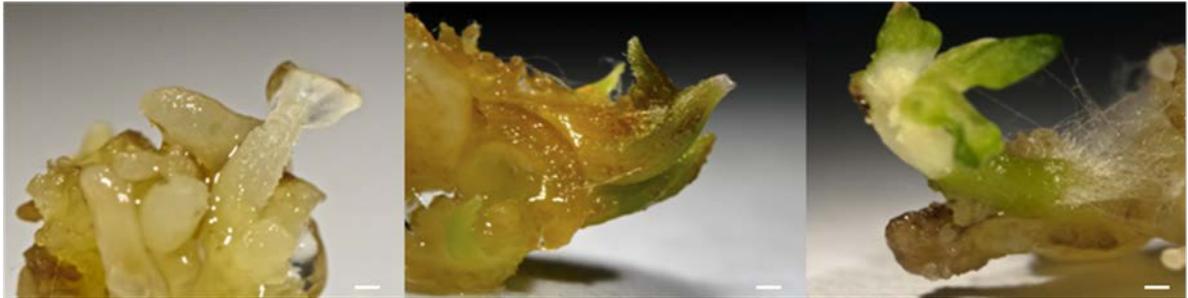


Figura 15 - Embriões somáticos submetidos à desidratação pela sacarose a 0,5M e PVS2 15 min não congelados em NL, cultivados em meio MS½ suplementado com fitagel a 2%, após 60 dias de cultivo. Barra = 1mm.

Foto: Dr. Antônio Carlos Freitas

A capacidade multiplicativa dos embriões submetidos ao tratamento com as soluções crioprotetoras (PVS2 e PVS3) por 15 minutos foi avaliada após 90 dias de cultivo em meio de cultura sólido MS½ suplementado com fitagel 2% (Tabelas 6 e 7) (Figura 16). Apesar das altas taxas de recuperação obtidas nos tratamentos de vitrificação testados (100%), a recuperação dos embriões após a cultura em meio MS suplementado com fitagel a 2% foi muito lenta. Por essa razão, a recuperação embriogênica após o tratamento com PVS2 foi também testada em meio líquido, com a mesma composição. Neste experimento, observou-se que, a maior desidratação obtida com a solução de sacarose 0,7M, apesar de reduzir a sobrevivência dos embriões não congelados favoreceu, proporcionalmente, em relação ao teor hídrico, uma taxa de recuperação de 40%, após o descongelamento (Tabela 8).

Com objetivo de otimizar a resposta de recuperação embriogênica após o tratamento com PVS2 e congelamento em NL também foi avaliada a utilização do fitorregulador BAP em diferentes concentrações no meio de indução embriogênica (MS suplementado com PIC 20µM). A suplementação com diferentes concentrações de BAP causou uma redução na capacidade de recuperação dos embriões após o seu descongelamento (Tabela 9). Entretanto, a utilização de BAP nas concentrações de (4,44 e 22,19µM), favoreceu o surgimento de calos, além de diferenças na coloração desses embriões (Figura 17).

A influência da composição do meio na recuperação de embriões submetidos à vitrificação e congelamento em NL, também foi avaliada a suplementação do meio líquido (MS + PIC 20µM) com diferentes concentrações de BAP. Observou-se que a presença de BAP melhorou a frequência de recuperação dos embriões (86%) (Tabela 10), em comparação com aqueles inoculados nos meios de cultura semi-sólidos com as mesmas composições (80%) (Tabela 9). Observou-se também que esse regulador induziu a recuperação de embriões congelados em todas as concentrações testadas, sendo obtida uma taxa máxima de recuperação de 92,5% para a concentração de 22,19 µM de BAP (Tabela 10). Foi possível

também observar células não morfogênicas em suspensão, o que indica possivelmente o desenvolvimento calogênese.

Tabela 6 - Frequência de recuperação de embriões somáticos de *Petiveria alliacea* L. submetida, ou não, ao congelamento em NL após tratamento com diferentes concentrações de sacarose e expostos por diferentes tempos de exposição ao PVS2, em meio de cultura semi-sólido MS $\frac{1}{2}$ suplementado com fitigel 2%, após 90 dias de cultivo.

Pré-cultura em sacarose (24h)	PVS2 (min)	Teor Hídrico (%)	Frequência de recuperação (%)	
			-NL	+NL
0,3M	15	45	85	25
0,5M	15	45	100	100
0,7M	15	61	100	80

Tabela 7 - Frequência de recuperação de embriões somáticos de *Petiveria alliacea* L. submetidos, ou não ao congelamento em NL após tratamento com diferentes concentrações de sacarose e expostos por diferentes tempos em solução de PVS3, em meio de cultura sólido MS $\frac{1}{2}$ suplementado com fitigel 2%, após 90 dias de cultivo.

Pré-cultura em sacarose (24h)	PVS3 (min.)	Teor Hídrico (%)	Frequência de Recuperação (%)	
			-NL	+NL
0,3M	15	37	100	100
	30	32	100	70
0,5M	15	38	100	50
	30	11	93	50
0,7M	15	38	100	50
	30	35	70	66



Figura 16 - Multiplicação dos embriões somáticos de *Petiveria alliacea* L. após 90 dias de cultura em meio MS $\frac{1}{2}$ suplementado com fitagel 2%, pré-tratados com PVS2 (15 min) e congelados em NL. Barra = 1mm.

Foto: Bianka de Oliveira Soares.

Tabela 8 - Frequência de recuperação de embriões somáticos de *Petiveria alliacea* L. congelados ou não em NL após tratamento com diferentes concentrações de sacarose e PVS2 por 15 min, cultivados em meio líquido MS $\frac{1}{2}$ após 60 dias de cultivo.

Concentração da sacarose na pré-cultura (M)	PVS2 (min)	Frequência de recuperação (%)	
		-NL	+NL
0,3	15	90	40
0,5	15	70	0
0,7	15	50	40

Tabela 9 - Frequência de multiplicação de embriões somáticos de *Petiveria alliacea* L. submetidos ao tratamento com sacarose 0,5M e PVS2 por 15 min, em meio de cultura semi-sólido MS suplementado com PIC (20 μ M), suplementado com diferentes concentrações de BAP, após 60 dias de cultivo.

Concentração de BAP no Meio de cultura (μ M)	Frequência de recuperação (%)	
	-NL	+NL
4,44	100	50
13,32	53	43
22,19	93	80

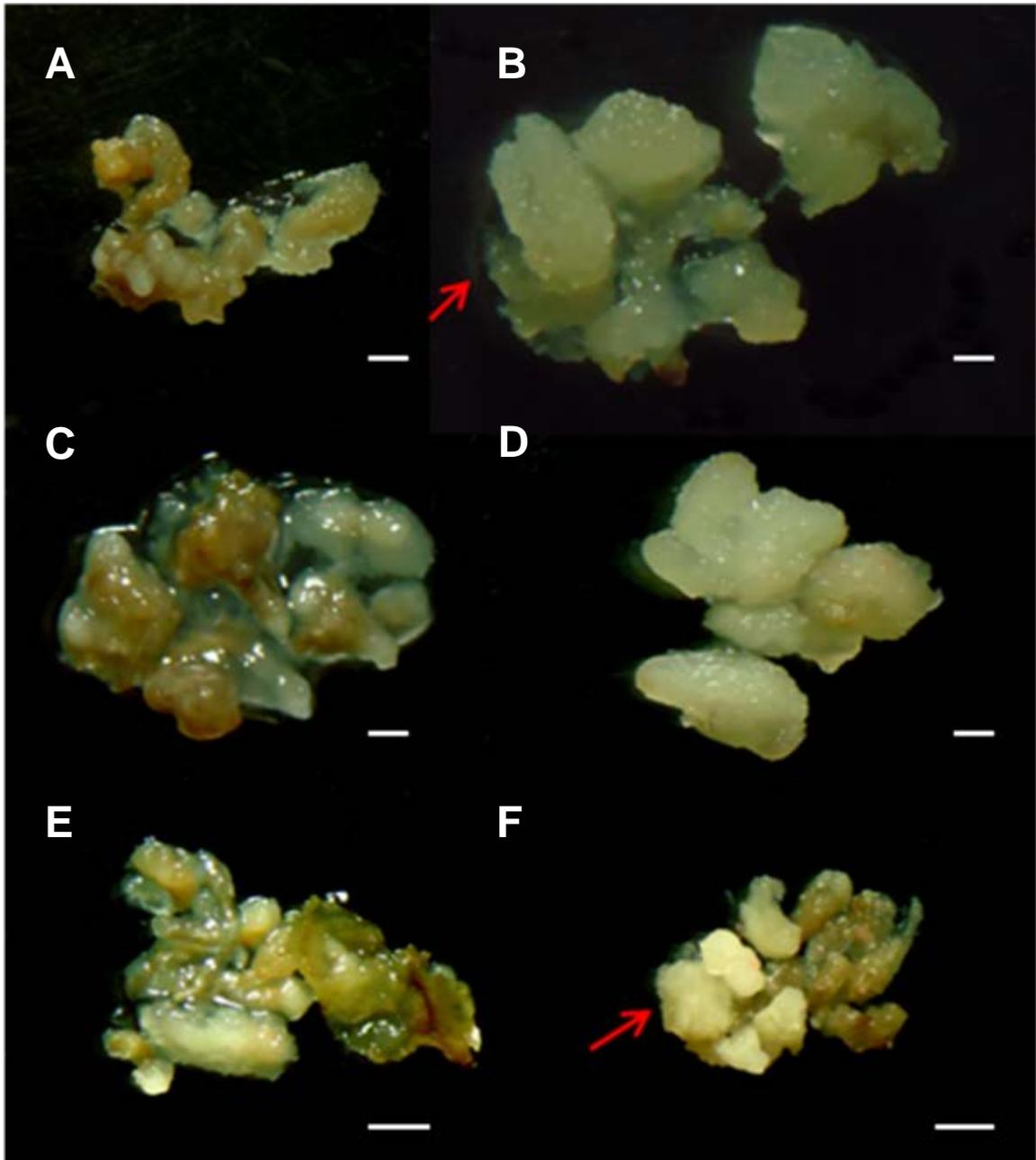


Figura 17 - Embriões somáticos de *Petiveria alliacea* L. submetidos ou não ao congelamento em NL e cultivados em meio MS + PIC (20 μ M) suplementado com diferentes concentrações de BAP.

Legenda: (A, C e E) embriões controles não congelados - BAP 4,44 μ M; 13,32 μ M e 22,19 μ M (respectivamente); (B, D e F) embriões congelados em NL - BAP 4,44 μ M; 13,32 μ M e 22,19 μ M, com a presença de calos (seta vermelha). Barra = 1mm.

Foto: Bianka de Oliveira Soares

Tabela 10 - Frequência de recuperação de embriões somáticos de *Petiveria alliacea* L. submetidos ao tratamento com sacarose 0,5M e PVS2 por 15 min, meio de cultura líquido MS suplementado com PIC (20 μ M) suplementado com diferentes concentrações de BAP, após 60 dias de cultivo.

Concentração de BAP no meio de cultura (μ M)	Frequência de recuperação (%)	
	-NL	+NL
4,44	100	50
13,32 μ M	100	50
22,19 μ M	93	86

4.3.3 Encapsulamento/vitrificação

Após a pré-cultura em sacarose 0,5M, a criopreservação também foi avaliada pela técnica de encapsulamento em alginato de cálcio. Assim os embriões foram primeiramente encapsulados e submetidos a diferentes tempos de exposição ao PVS2 (15, 30, 45 ou 60 minutos). Após 90 dias de cultivo foi possível observar a multiplicação dos embriões dentro da cápsula tanto em MS $\frac{1}{2}$ suplementado com fitagel 2% (Figura 18), quanto em MS suplementado com PIC (20 μ M) (Figura 19).

Nesse experimento, foi possível observar que quando encapsulados, os embriões somáticos resistiram aos maiores tempos de exposição à solução crioprotetora. Ambos os meios utilizados permitiram a recuperação de 100% dos embriões tratados com PVS2 em diferentes tempos de exposição (Tabela 11).



Figura 18 - Embriões somáticos encapsulados, pré-tratados com sacarose (0,5M) e PVS2, em processo de multiplicação em MS $\frac{1}{2}$ suplementado com fitigel 2%, após descongelamento.

Legenda: (A) multiplicação dentro da cápsula; (B) PVS2 15 minutos - cápsula já rompida; (C) PVS2 60 minutos. Barra = 1mm.

Foto: Bianka de Oliveira Soares

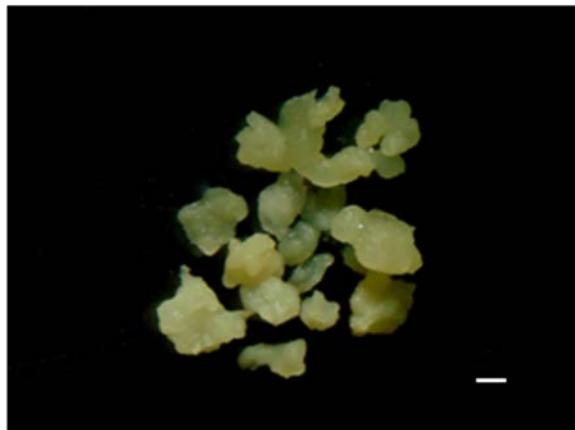


Figura 19 - Embriões somáticos encapsulados, pré-tratados com sacarose a 0,5M e PVS2 por 30 minutos e recuperados em MS suplementado com PIC 20 μ M, após o descongelamento. Barra = 1mm.

Foto: Bianka do Oliveira Soares

Tabela 11 - Criopreservação de embriões de *Petiveria alliacea* L. pré-tratados com sacarose 0,5M e PVS2 por diferentes períodos, encapsulados em alginato de cálcio e congelados em NL, após 60 dias de cultura em diferentes meios.

PVS2 (min)	Meios de cultura	Frequência de recuperação (%)	
		-NL	+NL
15	MS ^{1/2} +fitagel 2%	100	100
30		100	50
45		100	76
60		100	100
15	MS+PIC 20 μ M	100	65
30		100	100
45		100	47
60		100	47

4.3.4 Encapsulamento/desidratação

Amostras de embriões somáticos submetidos à desidratação em sacarose nas diferentes concentrações descritas (0,3 – 0,5 – 0,7M) foram encapsulados (ou não) e submetidos a uma desidratação suplementar, por exposição ao ar do fluxo laminar, por diferentes períodos de tempos (5, 10 ou 15 minutos).

Aparentemente, não houve diferença na recuperação dos embriões não encapsulados, submetidos à desidratação suplementar, entre os meios de cultura testados (Figura 20A e B). Os embriões expostos ao PVS2 por tempos maiores (15 minutos) mostraram uma pequena redução na percentagem de recuperação após o congelamento (Tabela 12). Apesar disso, as percentagens ainda foram elevadas (85%), indicando que a desidratação suplementar realizada foi benéfica no sentido de aumentar a tolerância dos embriões ao congelamento.

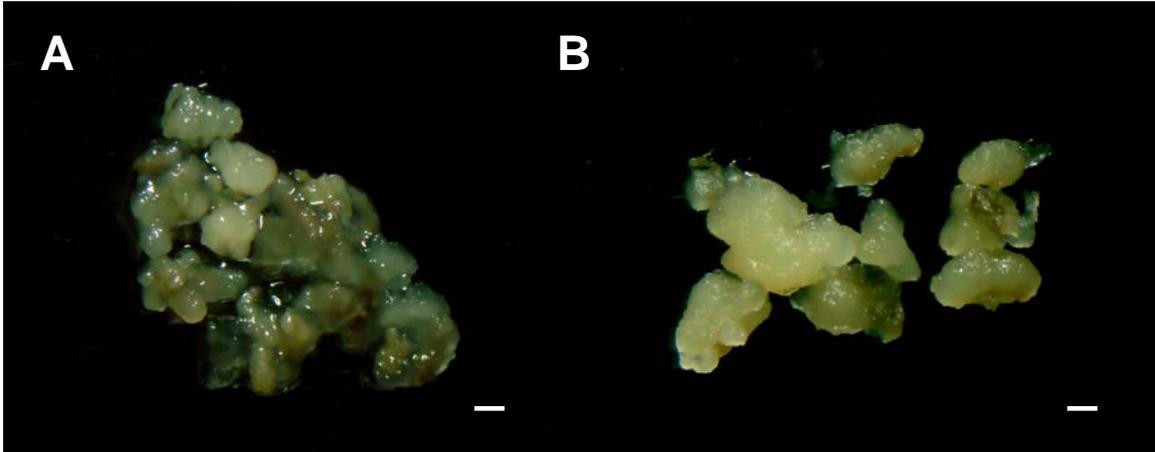


Figura 20 - Embriões somáticos não encapsulados, recuperados após desidratação em sacarose (0,3M) e exposição ao fluxo laminar por 5 min.

Legenda: (A) Meio MS $\frac{1}{2}$ suplementado com fitagel 2%;(B) Meio MS suplementado com PIC (20 μ M). Barra = 1mm.

Foto: Bianka de Oliveira Soares

Tabela 12 - Frequência de recuperação de embriões somáticos de *Petiveria alliacea* L. após desidratação prévia em sacarose não-encapsulados e desidratação suplementar em fluxo laminar e cultivo em diferentes meios de cultura, após 60 dias de cultivo.

Meios de cultura	Pré-cultura (24h)	Desidratação em fluxo laminar (min.)	Frequência de recuperação (%)	
			-NL	+NL
MS ^{1/2} +fitigel 2%	0,3M	5	100	100
		10	100	80
		15	90	80
	0,5M	5	100	95
		10	100	95
		15	100	90
	0,7M	5	100	100
		10	100	85
		15	100	85
MS+PIC (20µM)	0,3M	5	100	100
		10	100	100
		15	76	70
	0,5M	5	100	73
		10	100	90
		15	100	66
	0,7M	5	100	100
		10	95	70
		15	80	30

Em relação aos embriões encapsulados em alginato de cálcio, observou-se que, a desidratação prévia em sacarose a 0,7M junto com a desidratação suplementar no fluxo favoreceram a uma alta multiplicação embriogênica em meio MS suplementado com PIC (20 μ M) (Figura 21). Problemas técnicos impediram a quantificação do experimento realizado, não havendo tempo hábil para repetição. Entretanto, o experimento já se encontra em andamento para a continuação do projeto.



Figura 21 - Embriões somáticos submetidos à desidratação prévia em sacarose a 0,7M e pelo fluxo laminar por 5 minutos e recuperados em meio MS suplementado com PIC 20 μ M. Barra = 1mm.

4.4 Criopreservação de ápices caulinares

Ápices caulinares das plantas da linhagem AL passaram pelos mesmos tratamentos de desidratação e vitrificação utilizadas com os embriões, sendo submetidos às soluções crioprotetoras (PVS2 e PVS3) por 0, 30 ou 60 minutos e mantidos no escuro por 30 dias. A desidratação dos ápices foi avaliada pela pré-cultura em sacarose isoladamente (Tabela 13). Os resultados mostram que a pré-cultura isoladamente causou uma desidratação na faixa de 12 - 22 %, considerando-se todas as concentrações testadas. A pré-cultura combinada a cada solução de vitrificação testada também foi iniciada (Tabelas 14 e 15). Observou-se um aumento da desidratação em relação à pré-cultura isolada. Ápices tratados com os diferentes crioprotetores se mantém viáveis e se multiplicaram originando plantas completas em cultura.

Apesar das etapas de desidratação e pré-cultura terem sido estabelecidas satisfatoriamente, os experimentos para quantificação da sobrevivência dos ápices congelados foram prejudicados em decorrência de contaminação endógena, de difícil controle, apesar dos vários protocolos estabelecidos para a descontaminação dos explantes dessa espécie (resultados não mostrados). A repetição desses experimentos encontra-se em andamento para as próximas etapas do projeto.

Tabela 13 - Efeito do pré-tratamento com diferentes concentrações de sacarose no conteúdo hídrico dos ápices caulinares de *Petiveria alliacea* L.

Pré-cultura em sacarose (M)	Tempo de exposição (h)	Teor Hídrico (%)
0	-	87
0,3	24	67
0,5	24	75
0,7	24	65

Tabela 14 - Efeito do pré-tratamento no conteúdo hídrico dos ápices caulinares de *Petiveria alliacea* L. submetidos à pré-cultura e tratamento com PVS2 em diferentes tempos de exposição.

Pré-tratamento em sacarose (24h)	PVS2 (min)	Teor Hídrico (%)
0,3M	30	98
	60	56
0,5M	30	64
	60	34
0,7M	30	64
	60	77

Tabela 15 - Efeito do pré-tratamento no conteúdo hídrico dos ápices caulinares de *Petiveria alliacea* L. submetidos à pré-cultura e tratamento com PVS3 em diferentes tempos de exposição.

Pré-tratamento em sacarose (24h)	PVS3 (min)	Teor Hídrico (%)
0,3M	30	33
	60	25
0,5M	30	38
	60	24
0,7M	30	43
	60	42

5 DISCUSSÃO

Metodologias de conservação *in vitro* constituem uma alternativa importante aos métodos convencionais de conservação de germoplasma vegetal *ex situ*. Não se encontra na literatura, muitos estudos que abordem estratégias de conservação *ex situ* para *Petiveria alliacea* L., apesar do alto potencial medicinal dessa espécie. Neste trabalho foram desenvolvidos protocolos voltados para a multiplicação e conservação, baseados na amplificação meristemática e na embriogênese somática, visando também a produção de substâncias de interesse.

A conservação *in vitro* de germoplasma dessa espécie foi estudada anteriormente através de crescimento contínuo (ativo) de tecidos meristemáticos (CASTELAR *et al.*, 2011; SOARES, 2011) e embriogênese somática (CANTELMO, 2011).

A conservação de tecidos meristemáticos possibilita a multiplicação rápida do germoplasma conservado, facilitando sua utilização imediata. Neste trabalho, uma das linhagens utilizadas (AL) vem sendo mantida no Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ há oito anos por esse método, sem redução na frequência de regeneração dos diferentes explantes testados, por organogênese ou embriogênese somática.

A micropropagação a partir de plantas coletadas em diferentes regiões do Rio de Janeiro, também foi estabelecida anteriormente e essas plantas já foram avaliadas quanto à diversidade química na produção de terpenos e flavonóides (SOARES *et al.*, 2012). Entretanto, neste trabalho, a cultura das diferentes linhagens de *Petiveria alliacea* L., foi estabelecida a partir da germinação *in vitro* de sementes, devido às dificuldades em se obter plantas, em boas condições fitossanitárias, através da cultura de segmentos nodais das matrizes de campo, nesta etapa do projeto.

A partir das plantas obtidas por germinação foram também estabelecidos os protocolos de embriogênese somática, demonstrando-se o sucesso e a aplicabilidade dos protocolos estabelecidos anteriormente (CANTELMO, 2011) às novas linhagens estudadas neste trabalho.

O processo embriogênico de *Petiveria alliacea* foi influenciado pelo tipo de fitoregulador utilizado e pelo genótipo das diferentes linhagens. De acordo com a literatura, os melhores resultados de indução foram obtidos, para outras espécies, em resposta a PIC ou 2,4D, fitoreguladores que pertencem ao grupo das auxinas, e muito utilizados na obtenção de culturas embriogênicas (GUERRA *et al.*, 1999; VASIL, 1982). Neste grupo, o 2,4D e

Picloram são os mais empregados para esse fim (MORINI *et al.*, 2000; CASTILLO *et al.*, 1998, MENDOZA E KAEPLER, 2002; FEHÉR *et al.*, 2003; GUERRA E NODARI, 2006). Como relatado por CANTEMO (2011), neste trabalho a presença desses fitoreguladores também induziu a formação direta de embriões somáticos diretamente nos explantes das diferentes linhagens estudadas de *Petiveria alliacea* L. Além dos embriões, calos friáveis também surgiram em presença de PIC. Aparentemente, esses calos se originam dos próprios embriões, entretanto, essa hipótese ainda necessita de confirmação histológica.

A suplementação de meios de cultura com 2,4-D é frequentemente empregada para promover a formação de células embriogênicas, em diferentes espécies (FEHÉR *et al.*, 2003; GUERRA E NODARI, 2006). Outras respostas também já foram observadas, explantes foliares de *Cydonia oblonga* Mill mantidas *in vitro*, em presença de 2,4-D apresentaram a formação de estruturas nodulares de coloração vermelha e brotos além dos embriões somáticos, no mesmo explante (MORINI *et al.*, 2000). Da mesma forma, neste trabalho também se observou diferentes tipos de resposta regenerativa no mesmo explante, como o surgimento de raízes por via organogênica, e embriões somáticos diretos observados em explantes foliares da linhagem NT.

A embriogênese secundária descrita anteriormente na espécie (CANTEMO, 2011) foi reproduzida nas linhagens estudadas, quando os embriões eram transferidos para o meio de conversão (MS suplementado com fitagel 2%). Apesar da linhagem MH apresentar a maior taxa de proliferação de embriões diretamente a partir da folha inoculada (cerca de 213), foi a linhagem NT que apresentou uma taxa de multiplicação embriogênica maior, quando os embriões foram isolados e subcultivados em meio de conversão (MS ½ suplementado com fitagel 2%), em comparação com as outras linhagens estudadas (MH e VI), ao longo do tempo (cerca de 500 em 4 meses). Isto pode ser explicado pelo fato de apresentarem genótipos diferentes e conseqüentemente, possuírem células que apresentam competências diferentes a este tipo de resposta (NAMASIVAYAM, 2007).

A regeneração de plantas via embriogênese somática *in vitro* pode reduzir o tempo de multiplicação em muitas espécies oferecendo um sistema eficiente para a propagação clonal em massa, além de constituir uma alternativa para a preservação de espécies ameaçadas.

Entretanto, para o armazenamento *in vitro* a longo prazo, sem manipulação, apenas a criopreservação é considerada viável. Esta técnica apresenta custo-benefício favorável e oferece maior segurança na manutenção da fidelidade genética do material, devido ao bloqueio do metabolismo vegetal, nas condições de temperaturas ultra-baixas às quais o

material é submetido (MAZUR, 1970; ENGELMANN, 2004). Neste trabalho, foram avaliados diferentes protocolos baseados na desidratação, na vitrificação e no encapsulamento de embriões somáticos de *Petiveria alliacea* L. produzidos *in vitro*.

O teor hídrico presente dentro da célula e do movimento desta entre os meios intra e extracelulares são fatores essenciais para a obtenção de um protocolo eficiente de criopreservação (MAZUR, 2004). Os experimentos iniciais para avaliar a desidratação durante a pré-cultura foram realizados com embriões induzidos em folhas de plantas de origem embriogênica (AL), mantidas em cultura por 12 meses.

A desidratação pela sacarose normalmente constitui uma das etapas fundamentais na criopreservação. Neste trabalho, após os tratamentos com diferentes concentrações de sacarose observou-se que esses materiais sofreram uma desidratação proporcional à concentração de sacarose, sendo a concentração de 0,5M a mais adequada para a continuação dos testes devido a promover um nível ideal de desidratação (25%), sem diminuir significativamente a viabilidade, permitindo altas taxas de sobrevivência e recuperação de embriões. Resultados semelhantes foram obtidos com calos embriogênicos de *Dimocarpus logan* que, quando submetidos a altas concentrações de sacarose, produziram taxas significativas de regeneração (MATSUMOTO *et al.*, 2004). Entretanto, em muitos casos, a desidratação provocada por diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura, não é suficiente para induzir a tolerância ao congelamento, sendo necessários agentes crioprotetores penetrantes e não penetrantes através da membrana celular para se alcançar o nível ideal de desidratação no material que será criopreservado (REED, 2010).

Por essa razão, além da desidratação em sacarose, também foi avaliado o tipo de solução de vitrificação (PVS2 ou PVS3) e o tempo de exposição (0 a 60 min). Muitos estudos relatam porcentagens significativas de recuperação, após a criopreservação, de células embriogênicas de espécies herbáceas tratadas com esses crioprotetores (WANG, *et al.* 1994; JAIN, *et al.* 1996; MARTINEZ-MONTERO, *et al.*, 1998; MAGGAMAN *et al.* 1998).

Considerando as soluções crioprotetoras utilizadas neste trabalho, tem sido relatado para outras espécies, que o PVS2 geralmente promove a sobrevivência de embriões somáticos em taxas mais elevadas quando os tempos de exposição são menores (HUANG *et al.*, 1995; TSUKAZAKI *et al.*, 2000). Por outro lado o PVS3 permitiu a sobrevivência dos embriões somáticos de *Petiveria alliacea* L. em tempos maiores de exposição. O maior potencial de proteção do PVS3, em até 30 minutos pode ser explicado pela menor toxicidade para os

tecidos vegetais, na medida em que o DMSO não entra em sua composição (NISHIZAWA *et al.*, 1993; BARRACO *et al.*, 2011).

A sobrevivência dos embriões desidratados e vitrificados, em todos os tratamentos com sacarose, foi determinada pelo teste colorimétrico do Trifenil-tetrazólio (TTC) (MIKULA *et al.* 2006). Este método tem sido utilizado para avaliação qualitativa de viabilidade celular através da mudança da coloração do tecido para a cor vermelha (PETER *et al.*, 1967), e indicou que esses tratamentos não comprometeram a viabilidade e a regeneração de plantas. Foram obtidas taxas de sobrevivência de até 100%, indicando que a desidratação em sacarose constitui um pré-tratamento de desidratação adequado para a criopreservação dos embriões das linhagens estudadas. Neste trabalho, os embriões somáticos de *Petiveria alliacea* L., quando submetidos ao tratamento com PVS2 por 15 minutos, produziam uma taxa de 100% de sobrevivência e recuperação, detectadas pelo teste do TTC e pela avaliação da multiplicação dos embriões, respectivamente, após 90 dias de cultivo.

A técnica de encapsulamento desenvolvida inicialmente para a produção de sementes sintéticas (REDENBAUGH, 1991; ENGELMANN, 1997), tem sido empregada com sucesso, quando combinada a outras técnicas de criopreservação (encapsulamento/vitrificação e encapsulamento/desidratação). As cápsulas de alginato de cálcio formadas em torno do explante conferem maior resistência ao material vegetal que fica menos vulnerável aos efeitos lesivos da desidratação excessiva e do congelamento rápido (FABRE E DEREUDDRE, 1990; BENSON, 1999). Com base na literatura, o encapsulamento/desidratação utilizado com sucesso em embriões somáticos de outras espécies (GONZALES-ARNAO *et al.*, 1993; BHATTI *et al.*, 1997; GONZALES-ARNAO *et al.*, 1998; SHIBLI *et al.*, 2000) foi testado neste trabalho, sendo observado que, uma dessecação suplementar no fluxo, em conjunto com a desidratação prévia em sacarose 0,7M, favoreceu a uma alta multiplicação embriogênica no meio de indução, após o descongelamento. Nesse experimento a quantificação não pode ser realizada por conta de problemas técnicos e devido à lentidão da resposta embriogênica, impossibilitando a repetição do experimento em tempo hábil.

Em relação aos ápices, explantes considerados ideais para a conservação de germoplasma por conta da garantia de estabilidade genética, não foi possível conduzir os experimentos em função da contaminação endógena persistente durante a recuperação, apesar da pré-cultura ter sido padronizada. Esta etapa continua sendo otimizada para os próximos desmembramentos do projeto.

Estudos realizados anteriormente detectaram uma alta produção de Dibenzil trissulfeto, um polissulfeto importante com atividade antineoplásica e imunomodulatória, em extratos de embriões somáticos de *Petiveria alliacea* L. (WEBSTER *et al.*, 2008). Por essa razão, além da conservação de germoplasma, discutida acima, o sistema de embriogênese somática secundária, acoplado aos protocolos de criopreservação dessas estruturas contituem uma ferramenta que pode ser muito útil, após a otimização, para a produção e conservação de metabólitos especiais a partir de diferentes genótipos de *Petiveria alliacea* L., com reconhecido interesse farmacológico.

6 CONCLUSÕES

- ❖ Foi confirmada a eficácia dos fitorreguladores PIC (20 μ M) ou 2,4D (22,6 μ M) na indução da embriogênese somática direta em diferentes linhagens de *Petiveria alliacea* L., sendo o meio MS suplementado com PIC (20 μ M) o mais adequado para a indução desse processo nas linhagens estudadas, fornecendo o maior número de embriões por explante (cerca de 213), no período avaliado.
- ❖ O processo de multiplicação embriogênica (embriogênese secundária) foi observado com a supressão hormonal no meio de conversão (MS suplementado com fitagel 2%) e foi reproduzido, de forma variável, nas linhagens estudadas, podendo ser utilizado para a produção de metabólitos especiais.
- ❖ A presença de 2,4D (22,6 μ M) no meio MS induziu à formação de raízes em folhas de algumas linhagens de *Petiveria alliacea* L., podendo-se utilizar esse regulador para estudos de rizogênese.
- ❖ A conservação *in vitro* de *Petiveria alliacea* L, pelo crescimento ativo por médios longo prazo (1-10 anos) é viável através da cultura, por meio de explantes meristemáticos, uma vez que, pelo menos uma das linhagens vem sendo mantida por 8 anos, sem perda da capacidade de regeneração, por diferentes vias.
- ❖ A alta concentração de sacarose usadas no pré-tratamento para desidratação dos embriões, não impediram a sua multiplicação. A concentração 0,5M foi selecionada devido às altas percentagens de recuperação obtidas (100%).
- ❖ No protocolo de Vitrificação, o tratamento dos embriões com a solução de PVS2, foi influenciado pelo tempo de exposição. Neste trabalho, o menor tempo testado (15 minutos) não alterou a capacidade multiplicativa durante a fase de recuperação, entretanto, tempos maiores inviabilizaram a recuperação do material.

- ❖ O encapsulamento/vitrificação em alginato de cálcio promoveu uma proteção maior aos embriões, que desenvolveram maior tolerância à desidratação, suportando o tratamento com PVS2 por até 60 minutos, com uma taxa de 100% de recuperação após o descongelamento.

- ❖ A desidratação suplementar em fluxo laminar dos embriões não encapsulados e tratados com diferentes concentrações de sacarose, para controle da técnica encapsulamento/dessecação, aumentou a tolerância dos embriões ao congelamento, promovendo altas taxas de recuperação) e multiplicação (85%) após o descongelamento.

7 PERSPECTIVAS

- Avaliação da ocorrência de diferentes pigmentações observadas em embriões somáticos da linhagem NT.
- Otimização dos protocolos desenvolvidos para a criopreservação de embriões somáticos da linhagem estudada (AL) e adaptação para outros genótipos (NT, MH e VI).
- Otimização da conversão dos embriões somáticos recuperados após o processo de criopreservação.
- Aclimatização das plantas convertidas a partir de embriões recuperados após a criopreservação.
- Avaliação fitoquímica de embriões e raízes de plantas convertidas para identificação de polissulfetos.
- Avaliação da estabilidade genética de plantas convertidas a partir dos embriões somáticos.
- Estabelecimento de um protocolo de criopreservação de ápices caulinares das diferentes linhagens estudadas (AL, NT, MH e VI).
- Avaliação histológica dos embriões das diferentes linhagens estudadas (NT, MH e VI)
- Otimização do protocolo de vitrificação utilizando a solução crioprotetora PVS3.

REFERÊNCIAS

- AHUJA S., MANDAL B.B., DIXIT S., SRIVASTAVA P.S. Molecular, phenotypic and biosynthetic stability in *Discorea floribunda* plant derived from cryopreserved shoot tips. **Plant Science**, v. 163, p.971-977, 2002.
- ARNAO M.T.G., PANTA, A., ROCA, W.M., ESCOBAR, R.H., ENGELMANN, F. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 92, p.1-13, 2008.
- ARMITAGE, W.J., RICH, S.J. Vitrification of Organized Tissues. **Cryobiology**, v. 27, p.483-491, 1990.
- BHATTI, M.H., PERCIVAL, T., DAVEY, C.D.M., HENSHAW, G.G., BLAKESKEY, D., Cryopreservation of embryogenic tissue of a range of genotypes of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L] Lam.) using an encapsulation protocol. **Plant Cell Reports**, v.16, p.802-806, 1997.
- BAJAJ, Y.P.S., Regeneration of plants from frozen (-196° C) protoplasts of *Atropa belladonna* L., *Datura innoxia* Mill. and *Nicotiana tabacum* L. **Indian Journal Experimental Biology**, v. 26, p.289-292, 1988.
- BANERJEE, S., LANGHE, E. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). **Plant Cell Reports**, v. 4, p.351-354, 1985.
- BARRACO, G., SYLVESTRE, I., ENGELMANN, F. Comparing encapsulation-dehydration and droplet-vitrification for cryopreservation of sugarcane (*Saccharum spp.*) shoot tips. **Scientia Horticulturae**, v. 130, p.320-324, 2011.
- BENSON, E.E., HAMILL, J.D. Cryopreservation and post freeze 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.
- _____, Cryopreservation, In: BENSON, E.E. **Plant conservation biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1999. p.83-95.
- BHUSHAN, D., KUMAR, J.D., DOEL, R. Dehydration-responsive reversible and irreversible changes in the extracellular matrix: comparative proteomics of chickpea genotypes with contrasting tolerance. **Journal of Proteome Research**, v. 10, p. 2027-2046, 2011.
- BLAINSKI, A., PICCOLO, V.K., MELLO, J.C.P., OLIVEIRA, R.M.W. Dual effects of crude extracts obtained from *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae) on experimental anxiety in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 541-544, 2010.
- BUNN, E., SHANE, T., MAGGIE, P. The contribution of *in vitro* technology and cryogenic storage to conservation of indigenous plants. **Australian Journal of Botany**, v. 55, p. 345-355, 2007.
- BUTENKO, R.G., POPOV, A.S., VOLKOVA, L.A. Recovery of cell-cultures and their biosynthetic capacity after storage of *Dioscorea deltoidea* and *Panax ginseng* cells in liquid-nitrogen. **Plant Science Letters**, v. 33, p. 285-292, 1984.

CANTELMO, L.P. **Cultura de tecidos desdiferenciados a embriões somáticos de *Petiveria alliacea* L. visando à produção de substâncias bioativas.** 2011. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade do estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

CASSELS, A.C., CURRY, R.F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 64, p.145-157, 2001.

CASTELLAR, A. Cultura de tecidos e perfil fitoquímico de *Petiveria alliacea* L. **Dissertação de Mestrado** – Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

_____, GAGLIARDI, R.F., MANSUR, E. In vitro propagation and establishment of callus and cell suspensions cultures of *Petiveria alliacea* L., valuable medicinal plant. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, 2011 (aceito).

CASTILLO, A.M., EGANA, B., SANZ, J.M., CISTUE, L. Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain. **Plant Cell Reports**, v.17, p. 902-906, 1998.

CHMIELARZ, P., MICHALAK, M., PALUCKA, M., WASILEŃCZK, U. Successful cryopreservation of *Quercus robur* plumules. **Plant Cell Reports**, v. 30, p.1405-1414, 2011.

CHUA, S.P., NORMAH, M.N. Effect of preculture, PVS2 and vitamin C on survival of recalcitrant *Nephelium ramboutan*-like shoot tips after cryopreservation by vitrification. **Cryoletters**, v. 32, p.506-515, 2011.

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

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

_____. MENICHINI, F., SUAREZ, L.E.C. *Petiveria alliacea*: II further flavonoides and triterpenos. **Gazzeta Chimica Italiana**, v. 126, p. 275-278, 1996.

DICOSMO, F., MISAWA, M. Plant cell and tissue culture: Alternatives for metabolite production. **Biotechnology Advances**, v. 13, p.425-453, 1995.

DIXIT-SHARMA, S., AHUJA-GHOSH, S., MANDAL, B.B., SRIVASTAVA, P.S. Metabolic stability of plants regenerated from cryopreserved shoot tips of *Dioscorea deltoidea* – an endangered medicinal plant. **Scientia Horticulturae**, v. 105, p.513-517, 2005.

DUARTE, M.R., LOPES, J.F. Leaf and stem morphoanatomy of *Petiveria alliacea*. **Fitoterapia**, v. 76, p.599-607, 2005.

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

_____. Cryopreservation of embryogenic calluses of two commercial clones of *Hevea brasiliensis*. **Cryoletters**, v. 18, p. 107-116, 1997.

_____., TAKAGI, H. Cryopreservation of tropical plant germplasm. *Current Research Progress and Application*. **Japan International Research Center for Agricultural Sciences**, p. 238-244, 2000.

_____. Plant cryopreservation: Progress and prospects. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, v. 40, p. 427-433, 2004.

_____. Cryopreservation for plant biodiversity conservation. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, v. 46, p. S21-S22, 2010.

_____. Encapsulation-Dehydration for cryopreservation: Past, Present and Future. *Acta Horticulturae*, v. 908, p.165-171, 2011.

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

FABRE, J., DEUREUDDRE, J. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. **Cryoletters**, v.11, p. 413-426, 1990.

FANG, J., WETTEN, A. Importance of structural integrity of somatic embryos for long-term cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) germplasm. **African Journal of Agricultural research**, v. 6, p.3954-3961, 2011.

FEHÉR, A., PASTERNAK, T.P., DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p. 201–228, 2003.

_____. Why somatic plant cells start to form embryos? **Plant Cell Monographs**, p. 85-101, 2005.

FILHO, V.C.; ROSENDO, A.Y. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, p.99-105, 1998.

FOGLIO, M.A, QUEIROGA, C.L., SOUSA, I.M.O., RODRIGUES, A.F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Construindo a História dos Produtos Naturais**, v. 7, p. 1-8, 2006.

FULLER, B.J., LANE, N., BENSON, E.E. Life in the frozen state. CRC Press, 2004.

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

GOMES, P.B., OLIVEIRA, M.M.S., NOGUEIRA, C.R.A., NORONHA, E.C., CARNEIRO, L.M.V., BEZERRA, J.N.S., NETO, M.A., VASCONCELOS, S.M.M., FONTENELES, M.M.F., VIANA, G.S.B., SOUSA, F.C.F. Study of Antinociceptive effect of isolated

fractions from *Petiveria alliacea* L. 9tipi) in Mice. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 42-46, 2004.

_____. NORONHA, E.C., MELO, C.T.V., BEZERRA, J.N.S., NETO, M.A., LINO, C.S., VASCONCELOS, S.M.M., VIANA, G.S.B., SOUSA, F.C.F. Central effects os isolated fractions from the root of *Petiveria alliacea* L. (tipi) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 209-214, 2008.

GONZALES-ARNAO, M.T., ENGELMANN, F., URRRA, C., LYNCH, P. Crioconservacion de meristemas apicales de planta *in vitro* de caña de azucar mediante el metodo de encapsulacion/deshidratacion. **Biotecnologia Aplicada**, v. 10, p.1-4, 1993.

_____. ENGELMANN, F., URRRA, C., MORENZA, M., RIOS, A. Cryopreservation of Citrus apices using the encapsulation-dehydration technique. **Cryoletters**, v.19, p.177-182, 1998.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas, In: A.C. Torres, L.S. Caldas; J.A. Buso. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília DF: Ed.da Embrapa, 1999. v. 2, p. 533-568.

_____. NODARI, R. Introdução ao conceito de Biotecnologia. Curso de Agronomia, **Apostila de Biotecnologia**. Universidade Federal de Santa Catarina. 2006.

HUANG, C.N., WANG, J.H., YAN, Q.S., ZHANG, X.Q., YAN, Q.F. Plant regeneration from rice (*Oryza sativa* L.) embryogenic suspensions cells, cryopreserved by vitrification. **Plant Cell Reports**, v, 14, p.730-734, 1995.

JAIN, S., JAIN, R.K., WU, R.A. A SIMPLE AND EFFICIENT PROCEDURE FOR CRYOPRESERVATION OF EMBRYOGENIC CELLS OF AROMATIC Indica rice varieties. **Plant Cell Reports**, v,15, p.712-717, 1996.

KARTHA, K.K., MROGINSKI, L.A., PAHL, K., LEUNG, N.L. Germplasm preservation of coffee (*Coffea arabica* L.) by *in vitro* culture of shoot apical meristems. **Plant Science Letters**, v. 22, p. 301-307, 1981.

KIM, H., CHO, E., BACK, H., KIIM, C., K, E.R.J., ENGELMANN, F. Cryopreservation og garlic shoot tips by vitrification: effects of dehydration, rewarming, unloading and regrowth conditions. **Cryoletters**, v. 25, p. 59-70, 2004.

KUBEC, R., KIM, S., MUSAH, RAB, A. The Lachrymatory Principle of *Petiveria alliacea*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 37-40, 2003.

MA, X., BUCALO, K., DETERMANN, R.O., CRUSE-SANDERS, J.M., PULLMAN, G.S. Somatic embryogenesis, plant regeneration, and cryopreservation for *Torreya taxifolia*, a highly endangered coniferous species. **In vitro cellular Developmant Biological-Plant**, v. 48, p.324-334, 2012.

MACIEL, M.A.M., PINTO, A.C., VEIGA, V.E. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 23, p. 429-438, 2002.

MARTINEZ-MONTERO, M, GONZÁLEZ-ARNAO, M.T., BORROTO-NORDELO, C., PUENTES-DIAZ, C., ENGELMANN, F. Cryopreservation of sugarcane embryogenic callus using a simplified freezing process. **Cryoletters**, v, 19, p.171-176, 1998.

MATSUMOTO, K., RAHARJO, S.H.T., DHEKNEY, S., MOON, P.A., LITZ, R.E. Criopreservação e embriogênese somática de calos de *Dimocarpus longan*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** – Nota Científica, v.39, p. 1261-1263, 2004.

MAZUR, P., Cryobiology: The freezing of biological systems. **Science**, v. 168, p. 939-949, 1970.

_____, FULLER, B.J., LANE, N., BENSON, E.E. Life in the frozen state. **CRC Press**, p.5-55, 2004.

MENDOZA, M.G., KAEPLER, H.F. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). **In vitro Cellular & developmental Biology – Plant**, v.38, p.39-45, 2002.

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

MORINI, S., D'ONOFRIO, C. G., BELLOCCHI, G., FISICHELLA, M. Effect of 2,4D and light quality on callus production and differentiation from *in vitro* cultured quince leaves. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.63, p.47-55, 2000.

NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.90, p.1-8, 2007.

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

OZUDOGU, E., AYLIN, E., ERGUN, K. Cryopreservation of *Thymus cariensis* and *T. vulgaris* shoot tips: Comparison of three vitrification-based methods. **Cryoletters**, v. 33, p.363-375, 2012.

PETER, L., STEPONKUS, LANPHEAR, F.O. Refinement of the Triphenyl Tetrazolium Chloride method of determining cold injury. **Plant Physiology**, v, 42, p.1423-1426, 1967.

PONTE, J.J., FRANCO, A., SILVEIRA-FILHO, J. Preliminary investigation on the nematocide potentiality of Guine's plants (*Petiveria alliacea*). **Fitopatol. Venez**, v. 9, p. 14-15, 1996.

POPOVA, E., KIM, H., PAEK, K. Cryopreservation of coriander (*Coriandrum sativum* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 124, p. 522-528, 2010.

RAO, S. R., RAVISHANKAU, G. A., Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotecnology Advances**, v. 20, p.101-156, 2002.

REDENBAUGH, K., FUJI, J.A., SLADE, D., VISS, P., KOSSLER, M. Artificial seeds: Encapsulated somatic embryos. In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer-Verlag**, v, 17, p.395-414

REED, B. M., In: REED, B.M. **Plant Cryopreservation: A Practical Guide**. Springer, 2010. p. 1-513.

ROCA, W.M., Chapter 10, Cassava, in Handbook of Plant Cell Culture. Edited by SHARP, W.R., EVANS, D.A., AMMIRATO, P.V. and YAMADA, Y. **Crop Species**, v. 2, p. 269-301, 1984.

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

ROUT, G.R., SAMANTARAY, S., DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 91-120, 2000.

SAJINI, K.K., KARUN, A., AMARNATH, C.H. ET AL. Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos by vitrification. **Cryoletters**, v. 32, p.317-328, 2011.

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

SANTOS, M.C., LÉDO, A.S., LÉDO, C.A.S., SOUZA, F.V.D.S., JUNIOR, J.F.S., Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, p. 735-741, 2011.

SCOWCROFT, W.R., LARKIN, P.J. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell-cultures for plant improvement. **Biomedical and Life Science**, v. 60, p. 197-214, 1981.

SHIBLI, R.A. Cryopreservation of black iris (*Iris nigricans*) somatic embryos by encapsulation-dehydration. **Cryoletters**, v. 21, p.39-46, 2000.

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

_____, ENGELMANN, F. Vitrification, Encapsulation-Vitrification and Droplet-Vitrification: A Review. **Cryoletters**, v. 28, p. 151-172, 2007.

SOARES, B.O. **Caracterização botânica de plantas de *Petiveria alliacea* L. ocorrentes no Rio de Janeiro e estabelecimento do cultivo *in vitro***. Monografia (Bacharelado em Biologia) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. DBV/IBRAG/UERJ, 2010.

_____. **Micropropagação e avaliação da potencialidade genotóxica de *Petiveria alliacea* L.** Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

_____; FERNANDES, D.; CANTELMO, L.; ROCHA, L.P.; PETTINELLI, J.A.; CHRISTO, A.G.; COELHO, M.G.P.; GAGLIARDI, R.F. Botanical characterization of *Petiveria alliacea* L. from Rio de Janeiro, Brazil: systematic and functional implications. **Plant Biosystems**, 2012 (artigo aceito).

TSUKAZAKI, H., MILM., TOKUHARA, K., ISHIKAWA, K., Cryopreservation of *Doritaenopsis* suspension culture by vitrification. **Plant Cell Reports**, v, 19, p.1160-1164, 2000.

TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, DF: Ed. Embrapa. 1998. v. 1, p. 507.
 URUEÑA, C., CIFUENTES, C., CASTAÑEDA, D., ARANGO, A., KAUR, P., ASEA, A., FIORENTINO, S. *Petiveria alliacea* extracts uses multiple mechanisms to inhibit growth of human and mouse tumoral cells. **BioMed Central**, p. 1-17, 2008.

VASIL, I.K., Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses. **Plant Tissue Culture**, p.101-103, 1982.

VILLALOBOS, V.M., ENGELMANN, F. *Ex situ* conservation of plant germplasm using biotechnology. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 11, p. 375-382, 1995.
 VON ARNOLD, S. Somatic embryogenesis. In: Plant Propagation by Tissue Culture. 3ed. **Springer, The Netherlands**, v. 1, p. 335-354, 2008.

WANG, Z.Y., LEGRIS, G., NAGEL, J., POTRYKUS, I., SPRANGENBERG, G. Cryopreservation of embryogenic cell suspensions in *Festuca* and *Lolium* species. **Plant Science**, v, 103, p.93-106, 1994.

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

WENG, L., LI, W., ZUO, J., CHEN, C. Osmolality and unfrozen water content of aqueous solution of Dimethyl Sulfoxide. **Journal of Chemical & Engineering data**, v. 56, p. 3175-3182, 2011.

ZIMMERMANN, J.L., Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell**, v. 5, p. 1411-1423, 1993.