



**CIBELE MERCHED GALLO**

**CULTIVO *in vitro* E CRIOPRESERVAÇÃO DE  
*Vasconcellea quercifolia* A. St. Hil.**

**LAVRAS – MG  
2015**

**CIBELE MERCHED GALLO**

**CULTIVO *in vitro* E CRIOPRESERVAÇÃO DE  
*Vasconcellea quercifolia* A. St. Hil.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutora.

Orientador

Dr. Renato Paiva

Coorientadores

Dr. Luciano Coutinho Silva

Dra. Michele Valquíria dos Reis

Dr. Diogo Pedrosa Corrêa da Silva

**LAVRAS – MG**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo (a) próprio (a) autor (a).

Gallo, Cibele Merched.

Cultivo *in vitro* e Criopreservação de *Vasconcellea quercifolia*  
A. St. Hil. / Cibele Merched Gallo. – Lavras: UFLA, 2015.  
104 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2015.  
Orientador (a): Renato Paiva.  
Bibliografia.

1. Cultivo *in vitro*. 2. Mamãozinho-do-mato. 3. Multiplicação  
de brotações. 4. Embrião zigótico. 5. Micropropagação.  
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**CIBELE MERCHED GALLO**

**CULTIVO *IN VITRO* E CRIOPRESERVAÇÃO DE  
*Vasconcellea quercifolia* A. St. Hil.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2015.

Dra. Ana Hortência Fonsêca Castro	UFSJ
Dr. Breno Régis Santos	UNIFAL
Dra. Milene Alves de Figueiredo Carvalho	EMBRAPA CAFÉ
Dra. Fernanda Carlota Nery	UFSJ

Dr. Renato Paiva UFLA  
Orientador

Dr. Luciano Coutinho Silva  
Dra. Michele Valquíria dos Reis  
Dr. Diogo Pedrosa Corrêa da Silva  
Coorientadores

**LAVRAS – MG  
2015**

*À minha mãe, por todo amor e apoio na realização de meus sonhos.*

**OFEREÇO**

*Às minhas avós, Maria e Lacy*

*Às minhas tias, Adriane e Darlene*

*Ao meu namorado, Rafael*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe, Rose, pelo amor incondicional. Por ter me incentivado mais do que qualquer outra pessoa na minha vinda para Lavras, pela preocupação com meu desempenho no doutorado a ponto de nunca, nestes três anos, ter me falado que estava com saudade e triste devido a minha ausência, só para eu não perder o foco.

À minha família, em especial as minhas avós Maria e Lacy e minhas tias Adriane e Darlene, que me apoiam e acreditam na minha capacidade desde que eu nasci e que vibram e se sentem orgulhosas com minhas conquistas.

Ao meu amigo, companheiro namorado, e ainda “coorientador” Rafael, pelos momentos felizes, carinho e amor. Pela ajuda em todos os momentos, na prática, na escrita e nos estudos, por se preocupar se eu estava comendo, dormindo, se estava “rendendo” nos estudos para a qualificação e escrita da tese.

Às amigas de Pelotas, Maria Lúcia, Cristina e Laura pela ajuda com palavras de apoio e incentivo, quando eu estava desanimada.

Ao meu orientador Renato Paiva, pelo exemplo de profissional e de pessoa, pela oportunidade, ensinamentos, orientação, por sempre me receber em sua sala, pela atenção e preciosos conselhos, os quais ajudaram em meu crescimento.

Ao meu coorientador Luciano Coutinho, pela dedicação, boa vontade, disponibilidade e por ser um exemplo de profissional e de ser humano, pelos ensinamentos e por mostrar que um verdadeiro líder não tem necessidade de liderar contenta-se em apontar o caminho.

Aos amigos que adquiri nestes três anos, Rodrigo, Fernandinha, Mayara, Cecília, Marisa, Camila, Tina e Dany, pela ajuda sempre tão especial e pelos bons momentos que passamos dentro e fora do laboratório.

Aos pós-doutorandos Michele e Diogo, pelo apoio e ensinamentos no momento final, pelo tempo dedicado às correções e por fazer parte desta jornada, auxiliando-me e tornando possível a realização deste sonho.

À Dr.<sup>a</sup>. Elizete Beatriz Radmann, pelos ensinamentos, amizade e disponibilidade desde o mestrado.

Ao Prof. Dr. José Antônio Peters, por me aceitar em 2008 como estagiária voluntária em seu laboratório e ter me apresentado a Cultura de Tecidos de Plantas, área esta que é minha paixão.

Aos amigos que conheci em Lavras, Ana Rute e Cássia e Josiane e Seu Geraldo, pelo apoio e carinho neste período.

A todos os funcionários e professores, em especial a Lena e Joel, pelo auxílio prestado quando necessitei.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de ingressar no Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

E acima de tudo a Deus, por sempre me mostrar o melhor caminho, por nunca me abandonar, e, principalmente, por ter colocado cada uma das pessoas acima citadas em minha vida.

## **BIOGRAFIA**

Cibele Merched Gallo, filha de Rose Meri Vilanova Merched e Tércio Bacchieri Gallo, nasceu em 20 de setembro de 1986, em Pelotas-RS. cursou o 1º e 2º graus na escola Instituto Estadual de Educação Assis Brasil, finalizando o Ensino Médio, em 2003. Em março de 2005, ingressou como bolsista do Programa Universidade para Todos (Prouni) no curso de Ciências Biológicas-Licenciatura na Universidade Católica de Pelotas, concluindo o curso em 2008. Em 2010, ingressou no Mestrado em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Pelotas, o qual concluiu em 2012. Em março do mesmo ano, ingressou no Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal, na Universidade Federal de Lavras-MG, onde realizou pesquisas na área de micropropagação e criopreservação de espécies nativas, sob a orientação do Prof. Renato Paiva, Ph.D.

*Muitos acontecimentos na vida são desenhados pelo acaso, outros chamados de destino, porém o interessante mesmo é quando você faz suas escolhas conscientemente e percebe que está no lugar certo.*

## RESUMO GERAL

*Vasconcellea quercifolia* A. St. Hil. é uma espécie nativa do Brasil que apresenta potencial econômico devido à utilização de sua polpa e produção de doces a partir de seu caule. Apesar desse potencial, a espécie ainda apresenta carência de estudos. O cultivo e a conservação *in vitro*, por meio da criopreservação, são alternativas para a propagação em larga escala bem como a preservação da diversidade vegetal da espécie. No presente estudo teve-se como objetivos: (i) investigar alguns aspectos da micropropagação (germinação de embriões zigóticos, multiplicação, inibidores de etileno, enraizamento *in vitro* e aclimatização) e (ii) desenvolver protocolos de criopreservação de embriões zigóticos utilizando diferentes métodos de desidratação física. Para a micropropagação foram testados tipos de explantes para o estabelecimento *in vitro*, concentrações de BAP, inibidores da síntese de etileno, sistema de vedação e substratos para aclimatização. Para o estabelecimento *in vitro* a utilização de embriões zigóticos mostrou-se mais eficiente, sendo recomendada a adição de  $7,59 \mu\text{mol L}^{-1}$  de BAP para multiplicação *in vitro* e a vedação com papel alumínio. Em relação aos inibidores da síntese do etileno, o STS mostrou-se mais eficiente. Quanto à aclimatização, o substrato plantmax promoveu maior sobrevivência das plantas. Para a criopreservação foram testados tempos de desidratação dos embriões em fluxo laminar e sílica gel. Foi observado que embriões zigóticos de *V. quercifolia* perdem a viabilidade com o aumento do período de desidratação, sendo que a desidratação por 30 minutos utilizando câmara de fluxo laminar propiciou maior regeneração após a criopreservação ocorrendo aclimatização com sucesso de todas as plântulas provenientes de embriões criopreservadas. Para a desidratação com sílica gel não foi eficiente.

**Palavras-chave:** Conservação *in vitro*. Mamãozinho-do-mato. Multiplicação de brotações. Embrião zigótico. Micropropagação.

## GENERAL ABSTRACT

*Vasconcellea quercifolia* A. St. Hil. is a native species from Brazil that presents economic potential due to the use of its pulp and producing sweets from its stem. Despite this potential, the species still shows a lack of studies. The cultivation and maintenance in vitro by cryopreservation are alternatives for the large scale propagation and preservation of plant species diversity. In this study had the following objectives: (i) to investigate some micropropagation aspects (zygotic embryos germination, multiplication, ethylene inhibitors, rooting in vitro and acclimatization), and (ii) to develop cryopreservation protocols zygotic embryos using different methods of physical dehydration. For micropropagation were tested explant types for establishment in vitro, BAP concentrations, ethylene synthesis inhibitors, substrates and sealing system for acclimatization. Zygotic embryos use was more efficient for the establishment in vitro, and recommended the addition of  $7.59 \mu\text{mol L}^{-1}$  BAP for multiplication in vitro and seal with foil. Regarding the ethylene synthesis inhibitors, STS was more efficient. As for acclimatization, the plantmax substrate provided higher survival of plants. For cryopreservation was tested time dehydrating embryos in laminar flow and silica gel. It was observed that zygotic embryos *V. quercifolia* lose viability with increasing dehydration period, and dehydration for 30 minutes using a laminar flow hood provided higher regeneration after cryopreservation occurring acclimatization successfully all seedlings derived from embryos cryopreserved. For dehydration with silica gel was not efficient.

**Keywords:** Conservation in vitro. *Vasconcellea quercifolia*. Multiplication of shoots. Zygotic embryo. Micropropagation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Planta adulta de <i>Vasconcellea quercifolia</i> (mamãozinho-domato) (A), fruto imaturo (B) e flores (C).....	19
<b>CAPÍTULO 1</b>		
Figura 2	Porcentagem de germinação (%) em diferentes tipos de explantes de <i>Vasconcellea quercifolia</i> após 30 dias.....	38
Figura 2	Número de brotações (A); comprimento das brotações (B), número de folhas (C) de <i>V. quercifolia</i> após 30 dias em meio MS, com diferentes concentrações de BAP.....	40
Figura 3	Comprimento do explante (cm) obtidas com brotações de <i>V. quercifolia</i> cultivadas por 30 dias em meio MS, acrescido por diferentes concentrações de AgNO <sub>3</sub> .....	42
Figura 4	Número de folhas verdes e senescentes obtidas com brotações de <i>V. quercifolia</i> cultivadas por 30 dias em meio MS, acrescido por diferentes concentrações de AgNO <sub>3</sub> .....	42
Figura 5	Aspecto dos explantes de <i>V. quercifolia</i> mantidos por 30 dias em meio MS, acrescido por diferentes concentrações de AgNO <sub>3</sub> (μmol L <sup>-1</sup> ). Barra = 1,0cm.....	43
Figura 6	Aspecto dos explantes (A), comprimento do explante (B), número de folhas verdes e amarelas (C) e presença de raiz (D) de <i>V. quercifolia</i> cultivadas por 30 dias em meio MS, utilizando diferentes vedações. Barra = 1,0cm.....	45
Figura 7	Curva analítica com adições sucessivas de etileno (μL).....	47
Figura 8	Sobrevivência (A), número de folhas e número de raiz (B), comprimento da maior raiz e comprimento da planta (C), massa fresca e massa seca (D) de <i>V. quercifolia</i> cultivadas por 30 dias em diferentes substratos.....	49
<b>CAPÍTULO 2</b>		
Figure 1	Number of root and root length of <i>Vasconcellea quercifolia</i> according to different STS concentration. Bars (±SE) with the same letters are not different according to Tukey test.....	64
Figure 2	Explants of <i>Vasconcellea quercifolia</i> after 30 days exposed to different STS concentration.....	64
<b>CAPÍTULO 3</b>		
Figura 1	Fruto imaturo (A), semente (B) e embrião zigótico (C) de <i>Vasconcellea quercifolia</i> . Barra = 0,5 cm (A), 0,5 cm (B), 0,1cm (C).....	72
Figura 2	Comprimento da parte aérea (A), número de folhas (B), número de raízes e comprimento de raízes (C) de embriões de <i>V. quercifolia</i> germinados em diferentes períodos de desidratação em câmara de fluxo laminar.....	76
Figura 3	Comparação entre embriões de <i>Vasconcellea quercifolia</i> que	77

	não foram desidratados e embriões que foram desidratados por 300 minutos em câmara de fluxo laminar após 15 dias. Setas indicando a região apical da plântula. Barra = 3,0 cm.....	
Figura 4	Comprimento da parte aérea (A) e número de folhas (B) de plantas aclimatizadas de <i>Vasconcellea quercifolia</i> oriundas de embriões desidratados em diferentes períodos em câmara de fluxo laminar.....	79
Figura 5	Após aclimatização: Peso fresco e peso seco (A), número de raízes e comprimento de raiz (B) de plantas aclimatizadas de <i>Vasconcellea quercifolia</i> oriundas de embriões desidratados em diferentes períodos. de plantas de <i>Vasconcellea quercifolia</i> ..	80
Figura 6	Retomada do desenvolvimento dos embriões de <i>Vasconcellea quercifolia</i> desidratados por diferentes períodos e criopreservados após 15 (acima) e 30 (abaixo) dias após a criopreservação. Barra = 0,3 cm.....	82
Figura 7	Aspecto de planta oriunda de embrião criopreservado de <i>Vasconcellea quercifolia</i> após 30 dias de aclimação. Barra = 1,0 cm.....	83
	<b>CAPÍTULO 4</b>	
Figura 1	Teor de água de embriões de <i>V. quercifolia</i> após a desidratação por diferentes períodos (minutos) em sílica gel.....	95
Figura 2	Comparação da germinação de embriões de <i>Vasconcellea quercifolia</i> desidratados em diferentes períodos em sílica gel após 30 dias (D). Barra = 0,5 cm.....	96
Figura 3	Comprimento da parte aérea (A), número de raízes e comprimento da raiz (B) de plantas de <i>V. quercifolia</i> após 30 dias de germinação provenientes de embriões desidratados por períodos em sílica gel.....	97
Figura 4	Plantas de <i>V. quercifolia</i> após 30 dias de aclimatização provenientes de embriões desidratados por diferentes períodos em sílica gel. Barra = 3,0 cm (A), 2,0 cm (B), 2,5 cm (C), 1,5 cm (D) e 1,0 cm (E).....	98
Figura 5	Plantas de <i>V. quercifolia</i> após 30 dias de aclimatização provenientes de embriões desidratados por diferentes períodos em sílica gel. Comprimento da parte aérea (A) e número de folhas (B).....	100
Figura 6	Plantas de <i>V. quercifolia</i> após 30 dias de aclimatização provenientes de embriões desidratados por diferentes períodos em sílica gel. Peso fresco e peso seco (A), número de raízes e comprimento de raiz (B).....	101

## LISTA DE TABELAS

<b>CAPÍTULO 1</b>		
Tabela 1	Resultados das injeções das amostras de gás do interior dos frascos contendo explantes de <i>Vasconcellea quercifolia</i> em diferentes tratamentos.....	47
<b>CAPÍTULO 2</b>		
Table 1	Shoot length (SL) at the shoots base, number of green leaves (NGL) and callus formation (CF) of <i>Vasconcellea quercifolia</i> at different STS concentration after 30 days of culture.....	63
<b>CAPÍTULO 3</b>		
Tabela 1	Porcentagem de plantas de <i>Vasconcellea quercifolia</i> que sobreviveram à criopreservação (direita) e aclimatização após criopreservação (esquerda) em diferentes períodos de desidratação.....	81
<b>CAPÍTULO 4</b>		
Tabela 1	Porcentagem de embriões zigóticos que germinaram e plantas regeneradas após diferentes períodos de desidratação em sílica gel.....	96
Tabela 2	Porcentagem de embriões zigóticos de <i>Vasconcellea quercifolia</i> germinados e regenerados após criopreservação utilizando diferentes períodos de desidratação em sílica gel.....	102

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1	<i>Vasconcellea quercifolia</i> .....	19
2.2	Cultivo <i>in vitro</i> .....	20
2.2.1	Etileno.....	21
2.2.2	Cromatografia gasosa.....	22
2.3	Conservação <i>in vitro</i> .....	22
	REFERÊNCIAS.....	25
	CAPÍTULO 1.....	29
	Micropropagação e estudo do etileno no cultivo <i>in vitro</i> de <i>Vasconcellea quercifolia</i> A. St.-Hil.....	29
1	INTRODUÇÃO.....	31
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.1	Material Vegetal.....	33
2.2	Estabelecimento <i>in vitro</i> .....	33
2.2.1	Germinação <i>in vitro</i> .....	33
2.3	Indução de brotações <i>in vitro</i> .....	34
2.4	Estudo do etileno no cultivo <i>in vitro</i> .....	34
2.4.1	Inibição do etileno <i>in vitro</i> .....	34
2.4.2	Tipos de vedação no cultivo <i>in vitro</i> de brotações.....	35
2.4.3	Quantificação do etileno <i>in vitro</i> por cromatografia gasosa.....	35
2.4.3.1	Curva de calibração e quantificação.....	36
2.4.3.2	Instrumentação.....	36
2.4.3.3	Aclimatização.....	37
3	Análise estatística.....	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1	Estabelecimento <i>in vitro</i> .....	38
4.1.1	Germinação <i>in vitro</i> .....	38
4.2	Indução de brotações.....	39
4.3	Estudo do etileno no cultivo <i>in vitro</i> .....	41
4.3.1	Inibição do etileno <i>in vitro</i> .....	42
4.3.2	Tipos de vedação no cultivo <i>in vitro</i> de brotações.....	44
4.3.3	Quantificação do etileno <i>in vitro</i> por cromatografia gasosa.....	47
4.4	Aclimatização.....	48
5	CONCLUSÃO.....	51
	REFERÊNCIAS.....	52
	ANEXO.....	56
	CAPÍTULO 2.....	59
	Influence of Silver Thiosulfate Ethylene Inhibitor on <i>in vitro</i> Growth of <i>Vasconcellea quercifolia</i> A. St.-Hil. Shoots.....	59
	INTRODUCTION.....	61
	MATERIALS AND METHODS.....	62

	<b>RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	63
	<b>LITERATURE CITED.....</b>	66
	<b>CAPÍTULO 3.....</b>	68
	<b>Criopreservação de embriões zigóticos de <i>Vasconcellea quercifolia</i> utilizando a técnica de desidratação em fluxo laminar.....</b>	68
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	70
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	72
<b>2.1</b>	<b>Germinação.....</b>	72
<b>2.1.1</b>	<b>Material vegetal.....</b>	72
<b>2.1.2</b>	<b>Teor de água.....</b>	73
<b>2.1.3</b>	<b>Germinação.....</b>	73
<b>2.1.4</b>	<b>Aclimatização.....</b>	73
<b>2.2</b>	<b>Criopreservação.....</b>	74
<b>2.3</b>	<b>Análise estatística.....</b>	74
<b>3</b>	<b>RESULTADO E DISCUSSÃO.....</b>	75
<b>3.1</b>	<b>Teor de água.....</b>	75
<b>3.2</b>	<b>Germinação.....</b>	75
<b>3.3</b>	<b>Aclimatização.....</b>	78
<b>3.4</b>	<b>Criopreservação.....</b>	81
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	84
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	85
	<b>CAPÍTULO 4.....</b>	88
	<b>Uso da técnica de desidratação em sílica na criopreservação de embriões zigóticos de <i>Vasconcellea quercifolia</i> A. St. Hill (Caricaceae).....</b>	88
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	90
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	92
<b>2.1</b>	<b>Material vegetal.....</b>	92
<b>2.2</b>	<b>Teor de água.....</b>	92
<b>2.3</b>	<b>Germinação.....</b>	92
<b>2.3.1</b>	<b>Aclimatização.....</b>	93
<b>2.2</b>	<b>Criopreservação.....</b>	93
<b>2.3</b>	<b>Análise estatística.....</b>	94
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	95
<b>3.1</b>	<b>Germinação.....</b>	95
<b>3.2</b>	<b>Aclimatização.....</b>	98
<b>3.3</b>	<b>Criopreservação.....</b>	101
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	103
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	104

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil detém a maior biodiversidade do planeta, sendo considerado o país da megadiversidade, com 20% das espécies. Contém também em seu território a maior riqueza de espécies da flora, além dos maiores remanescentes de ecossistemas tropicais (BRASIL, 2015).

O interesse mundial por frutíferas nativas do Brasil está aumentando a cada ano. Entretanto, apesar da riqueza de recursos genéticos, as áreas de ocorrência natural vêm sendo eliminadas para a implantação de atividades agrícolas.

Entre as espécies nativas do Brasil destaca-se a *Vasconcellea quercifolia*. Esta espécie é uma árvore frutífera a qual apresenta importância ecológica intrínseca nos seus locais de ocorrência natural e importantes características de interesse no melhoramento genético, como tolerância a temperaturas baixas e fontes de resistência a doenças, além de ser espécies pioneiras e frutíferas utilizadas na alimentação humana e da fauna (KINUPP; LORENZI, 2014 ).

De acordo com Kinupp e Lorenzi (2014) destas plantas pode ser extraída a enzima proteolítica papaína, importante na indústria alimentícia, sendo utilizada como amaciante de carnes e clarificante de cervejas. Além disso, ela é rica em potássio, característica interessante para produção de alimentos dietéticos. Os frutos do mamãozinho-do-mato são consumidos *in natura* e em compotas, e a medula do caule é utilizada na fabricação de um doce chamado de doce-do-pau-ralado ou doce-de-jaracatiá.

Uma das formas de reduzir a pressão antrópica que as plantas nativas do Brasil, como o mamãozinho-do-mato sofrem, seria por meio da implantação de plantios comerciais. Entre os problemas para a implantação destaca-se o fato das sementes desta espécie possuírem dormência devido à presença de sarcotesta

(camada externa gelatinosa com componentes que inibem a germinação). Nesse contexto, a aplicação de técnicas de cultura de tecidos permite superar dificuldade da propagação por via sexuada, através da micropropagação (PINHAL et al., 2011).

A cultura de tecidos pode também auxiliar na conservação de material genético por meio da conservação *in vitro* que é definida como a manutenção do material *in vitro*, seja por meio do crescimento lento ou através da criopreservação. A técnica de criopreservação se resume a conservação de material em nitrogênio líquido a -196°C, assim, nestas condições, garantindo a conservação em longo prazo (REED et al., 2011). Esta técnica é segura e permite a repetibilidade dos protocolos e possibilidade de armazenamento por períodos indeterminados sem qualquer alteração nos materiais armazenados (CHEN et al., 2011). Nesse contexto, objetivou-se desenvolver um protocolo de micropropagação e criopreservação de embriões zigóticos de *Vasconcellea quercifolia*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Vasconcellea quercifolia*

A família *Caricaceae* é constituída de plantas com flores na ordem *Brassicales*, nativa de regiões tropicais e subtropicais da América do Sul e África. A família compreende cinco gêneros (*Carica*, *Cylicomorpha*, *Jacaratia*, *Jarilla* e *Vasconcellea*) e cerca de 35 espécies (CARVALHO; RENNER, 2012).

Laticíferos articulados contendo látex leitoso estão presentes em todos os órgãos de membros da *Caricaceae* (BADILLO et al., 2000; HEGNAUER et al., 1964). Esse látex é extensivamente estudado, principalmente devido à presença da papaína existente no látex de *Carica papaya* (OTTO; SCHIRMEISTER, 1997).

Entretanto, pesquisadores descobriram a presença de alta atividade proteolítica no látex de *Vasconcellea quercifolia* (Figura 1A), em comparação com o látex de *Carica papaya*. Neste mesmo trabalho foi identificada também uma nova protease de cisteína, com uma especificidade mais elevada do que a papaína (KYNDT et al., 2005).



**Figura 3** Planta adulta de *Vasconcellea quercifolia* (mamãozinho-do-mato) (A), fruto imaturo (B) e flores (C)

*Vasconcellea quercifolia* possui pequenos frutos (Figura 1B) que são consumidos *in natura* e em compotas, e a medula do caule é utilizada na fabricação de doces. Ainda em relação à indústria alimentícia, a enzima proteolítica papaína é importante sendo utilizada como amaciante de carnes e clarificante de cervejas. Além disso, ela é rica em potássio, característica interessante para produção de alimentos dietéticos (KINUPP; LORENZI, 2014).

Outra característica importante de *V. quercifolia* é sua resistência à doença *Papaya Ringspot Virus* (PRSV-P), também conhecida como mancha anelar, doença esta considerada economicamente importante. Sendo a mais devastadora e por muito tempo a maior ameaça à produção de mamão no mundo (CONOVER, 1964; LITZ, 1984).

## **2.2 Cultivo *in vitro***

A cultura de tecidos é uma técnica que permite o crescimento *in vitro* de células, tecidos ou órgãos vegetais isolados a partir de uma planta-mãe, em meio de cultura e condições controladas (GEORGE; HALL; KLERK, 2008).

Essa ferramenta permite a propagação de espécies que apresentam dificuldade de germinação, produção de mudas em larga escala, inclusão de espécies em bancos de germoplasma, além de aumentar a facilidade de trocas de materiais genéticos (PINHAL et al., 2011).

A micropropagação é a técnica de cultura de tecidos que se destaca por proporcionar resultados mais concretos, sendo utilizada para obtenção de plantas saudáveis e em larga escala (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Esta técnica compreende diversas etapas, sendo estas: o estabelecimento do explante *in vitro*, a multiplicação, a rizogênese até à aclimatização da microplanta (BASTOS et al., 2007).

O equilíbrio na utilização de substâncias reguladoras de crescimento é um dos fatores que afetam o sucesso do cultivo *in vitro*. Para o início da

rizogênese existe uma relação quantitativa entre os níveis de auxinas e citocininas endógenas, dependendo também da interação de muitos fatores fisiológicos, bioquímicos e ambientais, além da variação genotípica (FERREIRA et al., 2011).

Em relação à aclimatização, um ponto importante é a seleção do substrato, devido à sua influência no crescimento e desenvolvimento das plantas micropropagadas. Este deve ser firme e denso o suficiente para sustentar a planta, deve reter água em quantidade adequada, sem encolher ou expandir com a variação da umidade, ser livre de patógenos e espécies invasoras e não possuir níveis em excesso de salinidade (HOFFMANN et al., 1996).

### **2.2.1 Etileno**

O etileno é um hormônio vegetal volátil que está envolvido no desenvolvimento do sistema radicular por meio da integração de seus sinais com a biossíntese de auxinas, transporte, distribuição e sinalização, além de regular muitos aspectos do desenvolvimento da planta (VANDENBUSSCHE et al., 2012).

Este hormônio possui uma estrutura bastante simples ( $C_2H_4$ ), tamanho pequeno, e grande importância para o amadurecimento e frescor dos frutos (ZHANG et al., 2014). Entre outras características, o etileno tem se mostrado um forte inibidor do alongamento das células que são produzidas no meristema da raiz (LE et al., 2001; RŮZICKA et al., 2007). Assim, pode provocar a inibição no crescimento da raiz, do desenvolvimento de raízes laterais e agir de forma positiva na formação de pelos radiculares (SAINI et al., 2013).

Estudos sobre a utilização de inibidores de etileno são bastante comuns, devido sua ação negativa nas culturas *in vitro* (PASQUAL et al., 2002). Os íons de prata são considerados inibidores potentes e específicos da ação do etileno, sendo o tiosulfato de prata e o nitrato de prata umas das principais fontes deste

íon. A prata altera a capacidade dos receptores de etileno em transduzir o sinal para os componentes seguintes da cadeia de sinalização (TAIZ; ZEIGER, 2009).

### **2.2.2 Cromatografia gasosa**

O desenvolvimento da cromatografia gasosa se deu por esta ferramenta possuir potencial para realizar análises quantitativas, com rapidez na determinação de compostos orgânicos presentes em concentrações relativamente baixas em diferentes tipos de amostras. As matrizes complexas normalmente sofrem diferentes processos de extração e o composto de interesse pode ser então quantificado através desta técnica, que passa assim a ter grande importância na pesquisa científica básica e nas suas aplicações na indústria (HARRIS et al., 2001).

A Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada à Espectrometria de Massas, a Espectroscopia na Região do Infravermelho e do Ultravioleta e a Ressonância Magnética Nuclear destacam-se entre as ferramentas analíticas disponíveis para identificar e quantificar compostos em misturas (FARIA et al., 2007).

Durante o cultivo *in vitro* de algumas espécies, pode ocorrer acúmulo de etileno no microambiente no interior do frasco e por consequência efeitos negativos como a senescência. Desta forma, a cromatografia gasosa é uma técnica viável para quantificar o etileno a fim de comprovar não somente o causador de tais efeitos como também a ação de inibidores da síntese deste hormônio.

### **2.3 Conservação *in vitro***

Atualmente, a criopreservação é o método de conservação que garante o armazenamento em longo prazo de germoplasma. Possui vantagens em relação a outras metodologias de conservação, como a redução ou eliminação de danos causados no DNA, diminuição da necessidade de avaliações periódicas e

controle da viabilidade. Pode também contornar problemas como doenças e danos ambientais que podem afetar materiais conservados por outros métodos. Na criopreservação o material é armazenado em pequenos volumes e, teoricamente, pode-se armazená-lo por período de tempo ilimitado (ENGELMANN, 2011; PENCE, 2011).

A maioria dos materiais utilizados na criopreservação (suspensões de células, calos, meristemas, embriões) contém quantidades elevadas de água intracelular e são, portanto, extremamente sensíveis a lesões de congelamento causadas pela formação de cristais de gelo, quando expostos a baixas temperaturas (REED, 2008). As células devem, então, ser desidratadas artificialmente para que fiquem protegidas dos danos causados pela cristalização da água. As técnicas empregadas são classificadas de acordo com os mecanismos físicos sobre os quais se baseiam e são diferenciadas em metodologia clássica e metodologias contemporâneas (ENGELMANN, 2011).

Na metodologia clássica, as células vegetais são desidratadas a partir de um resfriamento lento, no qual as amostras são pré-tratadas com crioprotetores e resfriadas a uma temperatura intermediária ( $-35^{\circ}\text{C}$  a  $-40^{\circ}\text{C}$ ) a uma velocidade controlada ( $0,5 - 2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ). Desse modo, o gelo é formado nos espaços intercelulares, gerando um potencial osmótico que faz com que a água saia de dentro da célula, deixando o espaço intracelular com alta concentração de solutos. Quando as amostras entram em contato com o nitrogênio líquido, o citoplasma vitrifica, ou seja, ocorre a solidificação dos líquidos remanescentes sem sua cristalização (ENGELMANN, 2011; REED, 2008).

As metodologias contemporâneas baseiam-se na técnica de vitrificação, na qual a solidificação dos líquidos ocorre sem passar pela fase de cristalização devido às altas concentrações de crioprotetores às quais as amostras são expostas (REED, 2008). Após serem colocadas em meio com altas concentrações de substâncias crioprotetoras, as amostras são diretamente imersas em nitrogênio

líquido e, para diminuir a recristalização, o material deve ser rapidamente reaquecido (BENSON, 2008).

Substâncias crioprotetoras protegem as células de alcançarem um volume mínimo letal, além de diminuir a temperatura em que ocorre o congelamento. Tao e Li (1986) classificaram substâncias frequentemente utilizadas de acordo com sua capacidade de penetrar nas células como: incapazes de penetrar a parede celular (polímeros de alto peso molecular – PEG<sub>6000</sub>, PVP – polissacarídeos e proteínas); capazes de atravessar apenas a parede celular (oligosacarídeos, manitol, aminoácidos e polímeros de baixo peso molecular – PEG<sub>1000</sub>); penetram a parede e membrana celular (DMSO e glicerol). Substâncias penetrantes não devem ser tóxicas à célula nas concentrações requeridas (BENSON, 2008).

A penetração dessas substâncias contribui para uma maior osmolaridade. Entre as substâncias empregadas, normalmente para este fim, estão o glicerol, o dimetilsulfóxido e o metanol (BENSON, 2008). Esses compostos são empregados na composição da solução de vitrificação vegetal (PVS2) que foi desenvolvida por Sakai, Kobayashi e Oiyama (1990) e é muito utilizada nos processos de criopreservação. A solução é composta por 30% de glicerol (p/v), 15% etileno glicol (p/v) e 15% dimetilsulfóxido (DMSO; p/v) em meio de cultura basal (sem reguladores de crescimento), além de sacarose 0,4M e pH ajustado para 5,8 (SAKAI; HIRAI; NIINO, 2008).

## REFERÊNCIAS

- BADILLO, V. M. Carica L. *Vasconcellea* St. Hil. (Caricaceae) con la rehabilitación de este ultimo. **Ernstia**, Maracay, v. 10, n. 2, p. 74-79, 2000.
- BASTOS, L. P. et al. Cultivo *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 1122-1124, 2007.
- BENSON, E. E. Criopreservation theory. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant cryopreservation: a practical guide**. Corvalis: Springer, 2008.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em: 10 jan. 2015.
- CARVALHO, F. A.; RENNER, S. S. A dated phylogeny of the papaya family (Caricaceae) reveals the crop's closest relatives and the family's biogeographic history. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, n. 65 p. 46-53, 2012.
- CHEN, X. L. et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v. 77, n. 2, p. 397-403, 2011.
- CONOVER, R. A. Milk mosaic and faint mottler ringspot two papaya virus diseases of minor importance in Florida. **Proceedings of the Florida State for Horticultural Society**, Miami, n. 77, p. 444, 1964.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 47, n. 1, p. 5-16, 2011.
- FARIA, R. C. M. et al. Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de misturas biodiesel: diesel utilizando cromatografia gasosa-espectrometria de massas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 8, p. 1900-1905, 2007.

FERREIRA, J. P. et al. Enraizamento *in vitro* de clones de mamoeiro 'Tainung 01'. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 2, p. 563-566, 2011.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Dordrecht: The Background, 2008. v. 1, p. 520.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 183-260.

HARRIS, D. C., **Análise química quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2001.

HEGNAUER, R. **Chemotaxonomie der Pflanzen: B and 3 Dicotyledonae: Acanthaceae-Cyrtaceae**. Basel: Birkhauser Verlag, 1964. p. 297-301.

HOFFMANN, A. et al. **Fruticultura comercial: propagação de plantas frutíferas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1996. 319 p.

KINUPP, V. F.; LORENZI, H. **Plantas alimentícias não convencionais (pânc) no Brasil**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2014. p. 768.

KYNDT, T. et al. Molecular phylogeny and evolution of Caricaceae based on rDNA Internal Transcribed Spacer (ITS) and chloroplast sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, n. 37, p. 442-459, 2005.

LE, J. et al. In the early response of Arabidopsis roots to ethylene, cell elongation is up- and down-regulated and uncoupled from differentiation. **Plant Physiology**, Washington, v. 125, n. 2, p. 519-522, 2001.

LITZ, R. E. Papaya. In: SHARP, W. R. et al. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York: Mac Millan, 1984. v. 2, p. 349-368.

OTTO, H. H.; SCHIRMEISTER, T. Cysteine proteases and their inhibitors. **Chemical Reviews**, Washington, n. 97, p. 133-171, 1997.

PASQUAL, M. et al. Indução de calos em anteras de café (*Coffea arabica* L.) cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, p. 71-76, 2002.

PENCE, V. C. Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 47, p. 176-187, 2011.

PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos de tecidos em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, jul. 2011.

REED, B. M. et al. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 47, n. 1, p. 1-4, July/Aug. 2011.

REED, B. M. **Plant Cryopreservation: a practical guide**. Corvallis: Springer, 2008.

RUZICKA, K. et al. Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. **The Plant cell**, Rockville, v. 19, n. 7, p. 2197-2212, 2007.

SAINI, S. et al. Auxin: a master regulator in plant root development. **The Plant Cell**, Rockville, v. 32, n. 6, p. 741-757, 2013.

SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS-Based vitrification and encapsulation: vitrification protocols. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant cryopreservation: a practical guide**. Corvallis: Springer, 2008. p. 33-58.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Viçosa, MG: UFV, 2009. 220 p.

TAO, D.; LI, P. H. Classification of plant cell cryoprotectants. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 123, n. 1, p. 305-310, 1986.

VANDENBUSSCHE, F. et al. Ethylene in vegetative development: a tale with a riddle. **New Phytologist**, Cambridge, v. 194, n. 4, p. 895–909, 2012.

ZHANG, Z. et al. Multilayer interparticle linking hybrid MOF-199 for noninvasive enrichment and analysis of plant hormone ethylene. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 86, n. 7, p. 3533–3540, 2014.

**CAPÍTULO 1**

**Micropropagação e estudo do etileno no cultivo *in vitro* de *Vasconcellea quercifolia* A. St.-Hil**

**Revista Plant Cell Culture & Micropropagation**

## RESUMO

O mamãozinho-do-mato (*Vasconcellea quercifolia* A. St.-Hil.) é uma espécie nativa, pertencente à família Caricaceae, que apresenta resistência ao Vírus da Mancha Anelar (PRSV) do mamoeiro, podendo ser utilizada em programas de melhoramento vegetal de espécies do gênero *Papaya*. Objetivou-se investigar o cultivo *in vitro* (germinação de embriões zigóticos, multiplicação, inibidor de etileno AgNO<sub>3</sub>, enraizamento *in vitro* e aclimatização). Foram testados explantes para o estabelecimento *in vitro*, concentrações de BAP, inibidores da síntese de etileno, vedações e substratos para aclimatização. Para o estabelecimento *in vitro* a utilização de embriões zigóticos mostrou-se mais eficiente, recomendada a adição de 7,59 μmol L<sup>-1</sup> de BAP para multiplicação *in vitro* e vedação com papel alumínio. O AgNO<sub>3</sub> mostrou-se eficiente na inibição do etileno, produzindo plântulas com presença de raízes. A quantificação de etileno por cromatografia gasosa confirmou a ação de STS como inibidor. Quanto à aclimatização, o substrato plantmax promoveu maior sobrevivência das plantas.

**Palavras-chave:** Mamãozinho-do-mato. AgNO<sub>3</sub>. Etileno. Aclimatização.

## 1 INTRODUÇÃO

*Vasconcellea quercifolia* pertencente à família Caricaceae é originária da América do Sul. Conhecida popularmente como mamãozinho-do-mato, esta espécie possui grande potencial para exploração devido a sua resistência a baixas temperaturas e a doenças. Consumida como alimento pela fauna da região, também é utilizada na alimentação humana (KINUPP; LORENZI, 2014; TORRES et al., 2012).

O látex desse fruto apresenta alta atividade proteolítica, o qual se destaca principalmente a enzima papaína, além de conter uma das suas peptidases de cisteína, a qual estudos têm investigado seu isolamento e caracterização. Na indústria, esta enzima, é utilizada como componente para a fabricação de produtos dietéticos, devido a sua alta concentração de potássio (KONNO et al., 2004).

Dessa forma, é possível dizer que a *V. quercifolia* apresenta grande importância ecológica, econômica e medicinal. A micropropagação dessas espécies frutíferas representa uma gama de benefícios, principalmente por possibilitar a obtenção de um grande número de plantas, em curto espaço de tempo, com ótimo estado fitossanitário e manutenção das características genéticas (COUTO; OLIVEIRA; FORTES, 2004).

Vários fatores podem influenciar no cultivo *in vitro* de algumas espécies, um destes é o etileno. Portanto, estudos sobre a utilização de inibidores deste hormônio gasoso são bastante comuns, devido à ação negativa do etileno nas culturas *in vitro* (PASQUAL et al., 2002). Nestes estudos, os íons de prata são muito utilizados por serem considerados inibidores potentes e específicos da ação do etileno, sendo o tiosulfato de prata e o nitrato de prata umas das principais fontes deste íon (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Assim como a concentração de etileno, que está envolvido no desenvolvimento da planta no cultivo *in vitro* por meio da integração de seus sinais com a biossíntese de auxinas, transporte, distribuição e sinalização, a vedação

empregada no processo de fechamento dos frascos também afeta diretamente o microambiente proposto, interferindo nas trocas gasosas (SANTANA et al., 2008). Desta forma, alguns autores ressaltam a importância da realização de estudos envolvendo a utilização de inibidores de etileno (SAINI et al., 2013).

Dessa forma, objetivou-se estabelecer um protocolo de micropropagação, bem como estudar o efeito do etileno no cultivo *in vitro* de *Vasconcellea quercifolia*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material Vegetal

Para o estabelecimento *in vitro* de *V. quercifolia* os frutos maduros foram coletados de janeiro a março de 2014, no município de Lavras, sul de Minas Gerais, 21° 14' S e 45° 00' W Gr. e altitude 918 m. Após a coleta, os frutos passaram pelo processo de desinfestação em álcool 70% (1 minuto) e hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo (20 minutos) em câmara de fluxo laminar e por tríplice lavagem com água destilada e autoclavada. Em seguida foram retiradas as sementes dos frutos e novamente desinfestadas em álcool 70% (30 minutos), hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo (10 minutos) e tríplice lavagem com água destilada autoclavada.

### 2.2 Estabelecimento *in vitro*

Para o estabelecimento *in vitro*, foi realizado experimento de germinação comparando três tipos de explantes.

#### 2.2.1 Germinação *in vitro*

Para a germinação *in vitro*, foram comparados três tipos de explantes: semente inteira, semente sem tegumento (consistindo na remoção do tegumento) e somente o embrião zigótico (Figura 1). Após a desinfestação, os explantes foram inoculados em meio de germinação consistindo de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), adicionado 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e o pH foi ajustado para 5,8. Após inoculação, os explantes foram mantidos no escuro por uma semana. Em seguida, foram transferidos para sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, com fotoperíodo de 16 horas e

densidade de fluxo luminoso de  $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Aos 30 e 60 dias foi avaliada a porcentagem de germinação.

### **2.3 Indução de brotações *in vitro***

Para multiplicação *in vitro* de *V. quercifolia*, foram testadas diferentes concentrações de BAP (0; 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e 1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de AIB nas suas possíveis combinações. Como explantes iniciais foram utilizadas brotações apicais entre 1,0 e 1,5 cm estabelecidas *in vitro*. Utilizou-se o meio de cultura MS, o qual foi adicionado 30 g  $\text{L}^{-1}$  de sacarose, 7 g  $\text{L}^{-1}$  de ágar e o pH foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 120°C. Após inoculação, os explantes foram mantidos a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo luminoso de  $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , permanecendo nestas condições por 30 dias. Ao fim deste período foram analisados o número e o comprimento das brotações (cm) e ainda, o número de folhas por brotação.

### **2.4 Estudo do etileno no cultivo *in vitro***

Para o estudo do etileno *in vitro*, foram realizado experimentos de inibição de etileno, tipos de vedações e quantificação do etileno *in vitro* utilizando cromatografia gasosa.

#### **2.4.1 Inibição do etileno *in vitro***

Foram utilizadas como explantes iniciais brotações apicais (1-1,5 cm) com um par de folhas provenientes de plântulas estabelecidas *in vitro*. O meio utilizado foi MS adicionado de diferentes concentrações de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) (0; 0,2; 2,0 e 20,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) suplementado com 30 g  $\text{L}^{-1}$  de sacarose, 7 g  $\text{L}^{-1}$  de ágar e o pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C. Após a inoculação, os explantes foram mantidos no escuro por sete dias e, em seguida,

transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo luminoso de  $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  permanecendo nestas condições por 30 dias. Após esse período, foram avaliados o comprimento do explante (cm), a presença de raiz e o número de folhas verdes e/ou amarelas.

#### **2.4.2 Tipos de vedação no cultivo *in vitro* de brotações**

Para verificar a influência de vedações foram testados diferentes tipos de vedantes (algodão, alumínio, tampa plástica e filme de polivinilcloro). Foram utilizadas como explantes iniciais brotações apicais (1,0-1,5 cm) com um par de folhas provenientes de plântulas estabelecidas *in vitro*. O meio utilizado foi MS suplementado com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $7 \text{ g L}^{-1}$  de ágar e o pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a  $120^\circ\text{C}$ . Após a inoculação, os explantes foram mantidos no escuro por sete dias e, em seguida, transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e irradiância de  $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  permanecendo nestas condições por 30 dias. Em seguida foram avaliados o comprimento do explante, número de folhas verdes e/ou amarelas e presença de raiz.

#### **2.4.3 Quantificação do etileno *in vitro* por cromatografia gasosa**

Foram realizados ensaios de quantificação do hormônio vegetal gasoso etileno *in vitro* utilizando o meio MS como controle, o inibidor STS (Tiosulfato de prata) e o precursor ACC (ácido- 1, aminociclopropano carboxílico) em explantes de *V. quercifolia* cultivados *in vitro*.

A solução estoque de STS (1mM) foi preparada a partir de soluções estoque de tiosulfato de sódio e nitrato de prata na razão molar de 1:4, sendo esterilizada por microfiltração.

Para determinar a influência do inibidor da ação do Tiosulfato de prata ( $\text{Ag}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) (STS) e do precursor ACC de etileno, brotações provenientes de

cultivo *in vitro* e com aproximadamente 1,0 cm foram transferidas para os seguintes tratamentos: MS (meio de cultura suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e o pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C), MS acrescido de 1,0 µmol L<sup>-1</sup> de ACC, MS com 1,0 µmol L<sup>-1</sup> de STS, e a ausência (MS sem o STS ou ACC) sendo utilizado tubo de vidro (25x150 mm) contendo 10mL de meio e com tampa de borracha. Este material permaneceu por 15 dias a 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo luminoso de 48 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

#### **2.4.3.1 Curva de calibração e quantificação**

Inicialmente foi construída uma curva analítica com adições sucessivas de etileno (0,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0; 100,0 µL), obtendo assim diferentes pontos de concentração em função da área de pico, deste hormônio vegetal.

Após 15 dias de cultivo foram analisados os três tratamentos (MS, MS com a adição de 1,0 µmol L<sup>-1</sup> de ACC e MS com a adição de 1,0 µmol L<sup>-1</sup> de STS), em triplicata, para a quantificação de etileno, nestas amostras.

Alíquotas de 1 mL provenientes de três tubos de cada tratamento foram coletadas no interior do tubo utilizando-se a atmosfera interna para a sucção por meio de uma seringa hermética.

#### **2.4.3.2 Instrumentação**

A leitura foi realizada utilizando-se o cromatógrafo CG 2010 plus equipado com detector de ionização de chama (FID) de 245°C e uma coluna Carboxen (50946-031) 30m/0,53m (DI) 1µm (filme), Gás de arraste N<sub>2</sub>, velocidade linear a 46,2cm/seg, pressão a 35kpa, coluna 120°C, tempo de equilíbrio de 2,2 min e rampa 120°C por um minuto.

### 2.4.3.3 Aclimatização

Foram enraizadas brotações cultivadas *in vitro* utilizando-se o meio MS com a adição de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de STS, em seguida o pH foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após 30 dias as brotações enraizadas foram aclimatizadas utilizando-se três diferentes substratos: vermiculita, substrato comercial Plantmax® e uma mistura (vermiculita + substrato comercial; 1:1). As plantas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura média de  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Decorridos 30 dias, foram avaliadas as taxas de sobrevivência, a massa fresca e seca (g) e o incremento ao comprimento das plantas (cm).

## 3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com 20 repetições, sendo cada repetição constituída por um tubo de ensaio contendo um explante. Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de F de Tukey, com 5% de probabilidade, utilizando-se o software WinStat – Sistema de Análises Estatísticas para o Windows, versão 1.0 (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2005).

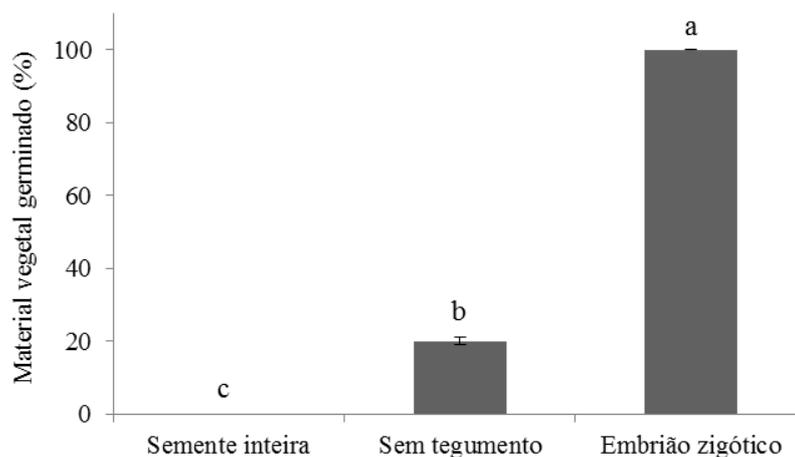
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Estabelecimento *in vitro*

Para o estabelecimento *in vitro*, foi realizado experimento de germinação comparando três tipos de explantes.

#### 4.1.1 Germinação *in vitro*

A maior porcentagem de germinação ocorreu utilizando somente o embrião zigótico como explante, atingindo 100% de germinação (Figura 1). Nesse caso, a emergência iniciou no oitavo dia após a inoculação. Melo e Seleguini (2013) obtiveram primeiro a germinação do embrião de *Carica papaya*, quando foi removida a sarcotesta destas sementes. Estes pesquisadores relataram que a presença deste envoltório afeta negativamente a germinação.



**Figura 1** Porcentagem de germinação (%) em diferentes tipos de explantes de *Vasconcellea quercifolia* após 30 dias

Foi observada diferença significativa das sementes com e sem tegumento a qual nenhuma semente com tegumento apresentou germinação e somente 20% das sementes sem tegumento germinaram.

Uma baixa taxa de germinação (1 a 3%) das sementes *V. quercifolia* foi também verificada por Gerber et al. (2014) no estabelecimento *in vitro* com diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> (Ácido giberélico). Estes autores afirmam que tais resultados ocorrem devido à presença da sarcotesta. Que apesar de ter sido realizada a lavagem das sementes em água corrente ainda houve presença de sarcotesta, mesmo em pouca quantidade. Esta membrana promove a germinação lenta e desuniforme das espécies da família Caricaceae, sendo uma barreira mecânica para entrada de água no interior das sementes (LOPES, 2009; TOKUHISA et al., 2007).

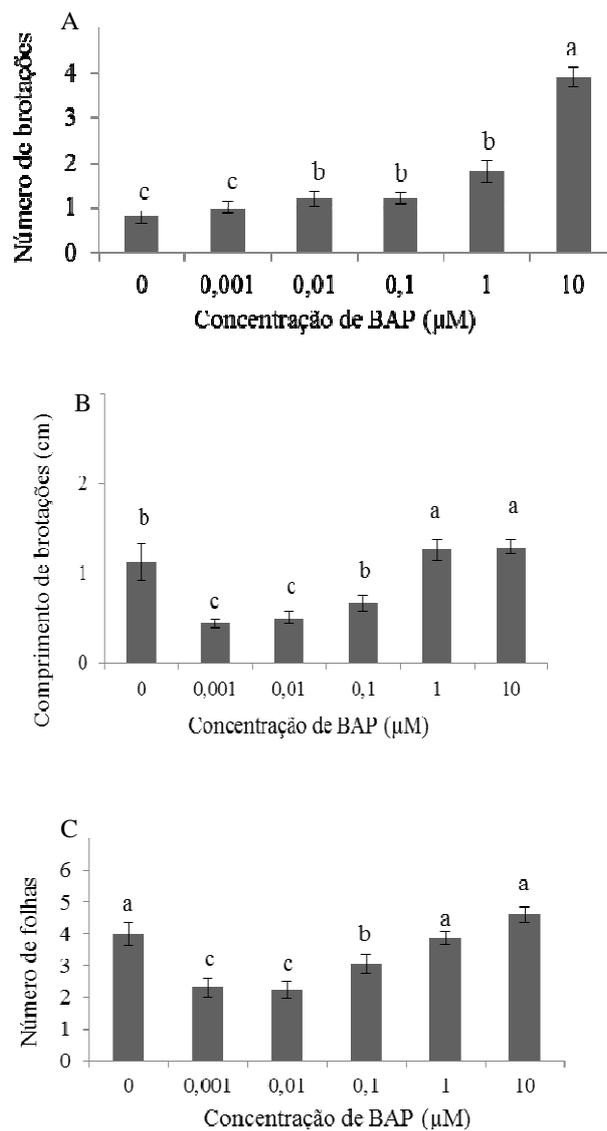
#### **4.2 Indução de brotações**

Para a indução de brotações foi observada diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre diferentes concentrações do BAP em relação ao número e comprimento de brotações (Figura 2A e 2B, respectivamente). O maior número de brotações foi observado com 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de BAP que apresentou melhor resultado nesta variável, com 3,9 brotações por explante.

O maior comprimento de brotações foi observado com 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de BAP apresentando melhor resultado nesta variável, com 1,29 cm de comprimento por brotação (Figura 2B). Os resultados obtidos com o presente trabalho diferem com os resultados apresentados por Mumo et al. (2013), trabalhando com *Carica papaya* verificando que altas concentrações de BAP não favoreceram o crescimento das brotações, quando comparados com outras citocininas.

O maior número de folhas foi observado com 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de BAP, com 4,6 folhas (Figura 2C). Nos estudos de Lima et al. (2007) com hortelã verde (*Menta viridis* L.), não foi verificado o incremento significativo no número de folhas em

função do aumento das concentrações de BAP. Resultado semelhante foi observado por Vidal, Diniz e Silva (2013), os quais observaram a tendência de redução no número de folhas por brotação, com o aumento da concentração de BAP.



**Figura 2** Número de brotações (A); comprimento das brotações (B), número de folhas (C) de *V. quercifolia* após 30 dias em meio MS, com diferentes concentrações de BAP

Apesar de ser relatada na literatura a possibilidade de que concentrações maiores de citocininas, em meio de cultura, apresentaram potencial negativo para o desenvolvimento de brotações (GEORGE; HALL; KLERK, 2008), em *V quercifolia* foi observado que a maior concentração de BAP utilizada induziu a ocorrência de maiores quantidades de brotações por explante. Este resultado corrobora com a afirmação de Cheng et al. (2013), os quais relataram que a baixa concentração de auxina combinada com a alta concentração de citocinina pode facilitar a indução de brotações.

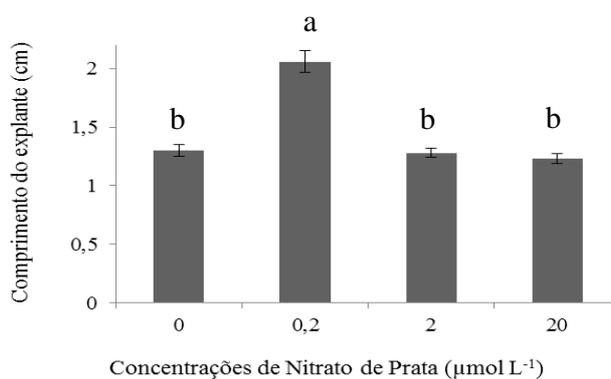
Concentrações elevadas de citocinina podem incrementar a atuação da citocinina oxidase, impedindo a atuação deste hormônio sobre a divisão celular e, conseqüentemente, a indução de brotações. Altas concentrações de citocininas também podem apresentar efeito tóxico, caracterizando-se principalmente pelo baixo número de brotações, entufamento demasiado e falta de alongamento das hastes, redução do tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento exagerado dos caules e vitrificação generalizada, o que leva a sérios problemas na fase de enraizamento (SANTOS SEREJO et al., 2006). Entretanto, não foi verificado nenhum efeito tóxico nas brotações de *Vasconcellea quercifolia*, ou seja, a adição de BAP durante a multiplicação *in vitro* desta espécie não foi prejudicial no cultivo *in vitro*.

#### **4.3 Estudo do etileno no cultivo *in vitro***

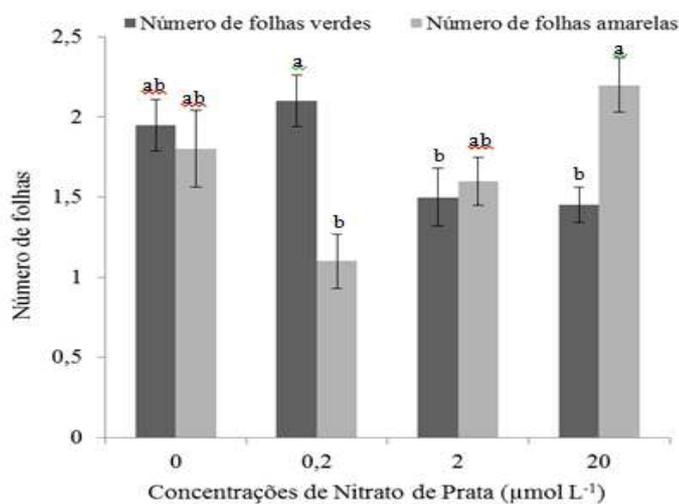
Para o estudo do etileno *in vitro*, foram realizado experimentos de inibição de etileno, tipos de vedações e quantificação do etileno *in vitro* utilizando cromatografia gasosa.

### 4.3.1 Inibição do etileno *in vitro*

Foi observada diferença significativa nas variáveis: comprimento do explante ( $p < 0,0001$ ) (Figura 3), número de folhas verdes ( $p = 0,009$ ) e número de folhas amarelas ( $p = 0,0013$ ) (Figura 4), conforme demonstrado na figura 5.



**Figura 3** Comprimento do explante (cm) obtidas com brotações de *V. quercifolia* cultivadas por 30 dias em meio MS, acrescido por diferentes concentrações de  $\text{AgNO}_3$



**Figura 4** Número de folhas verdes e senescentes obtidas com brotações de *V. quercifolia* cultivadas por 30 dias em meio MS, acrescido por diferentes concentrações de  $\text{AgNO}_3$



**Figura 5** Aspecto dos explantes de *V. quercifolia* mantidos por 30 dias em meio MS, acrescido por diferentes concentrações de  $\text{AgNO}_3$  ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Barra = 1,0cm

Os explantes cultivados em meio de cultura com  $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{AgNO}_3$  apresentaram maior comprimento de parte aérea (2,1 cm). Neste mesmo tratamento o material vegetal apresentou maior número de folhas verdes com a média igual (2,1) e o menor número de folhas amarelas (1,1), como pode ser verificado na figura 4. Em relação à variável número de folhas verdes, não houve diferença entre o tratamento com ( $0,2 \mu\text{mol}^{-1}$ ) e sem nitrato de prata, sendo que nos demais tratamentos a presença deste íon reduziu a quantidade de folhas verdes.

Em relação ao número de folhas, o tratamento que apresentou o maior número de folhas verdes foi o de  $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$  de nitrato de prata e o tratamento que apresentou maior número de folhas amarelas foi o de  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de nitrato de prata. O maior número de folhas amarelas pode ocorrer devido à provável ação tóxica do nitrato de prata. Nepomuceno et al. (2007) ao avaliarem dois tipos de inibidores de etileno no cultivo *in vitro* de angico, observaram que

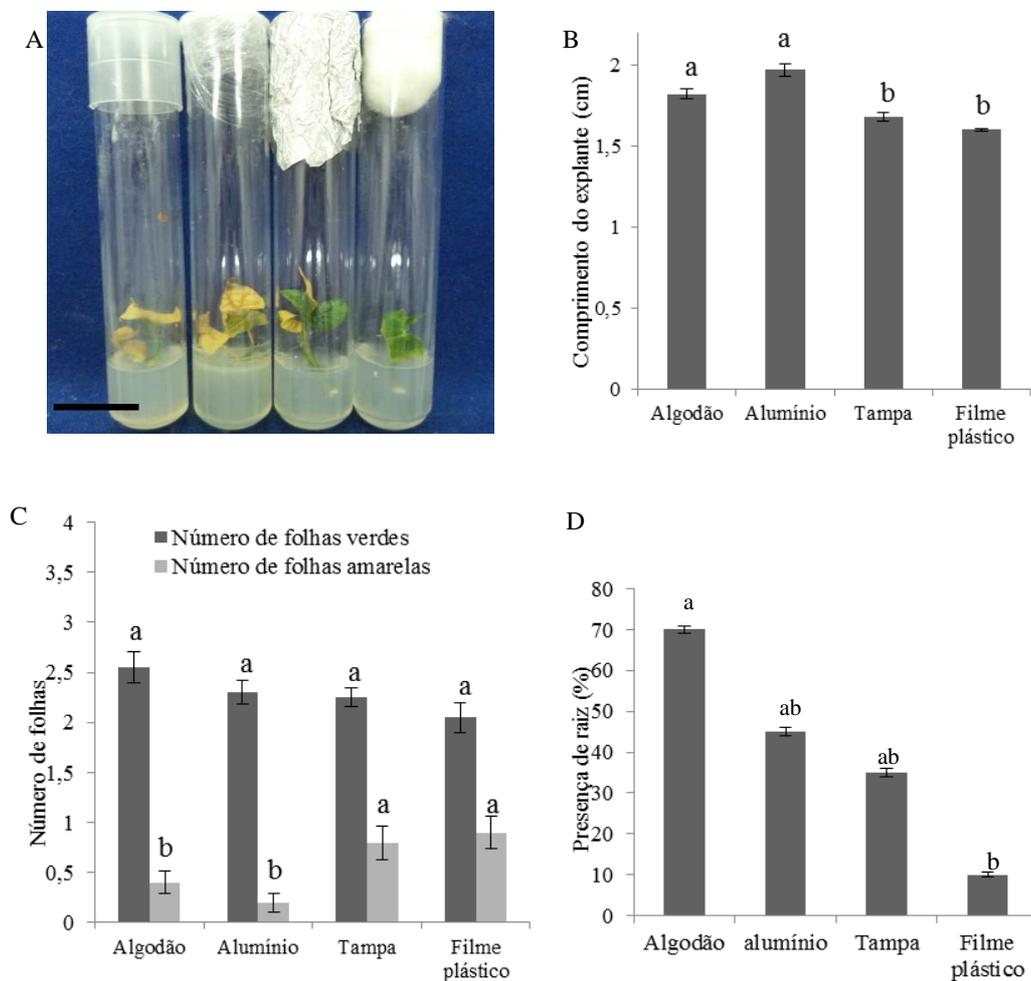
quando utilizaram  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de nitrato de prata no meio de cultura houve um aumento na quantidade de número de folhas.

Ainda em relação ao comprimento do explante em função da utilização de inibidores da ação do etileno, resultados concordantes foram encontrados na multiplicação *in vitro* de *Vanilla planifolia* (GIRIDHAR et al., 2001), no qual os autores observaram um efeito positivo da adição de  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de nitrato de prata ao meio de cultura, promovendo o aumento no tamanho das brotações. Goh et al. (1997), durante a micropropagação de *Garcinia mangostana* observaram que a adição de nitrato de prata em maiores concentrações (de 10 e  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) promoveu um aumento significativo no número de brotos regenerados. Ozden-Tokatli et al. (2005) observaram que a adição de  $48 \mu\text{mol L}^{-1}$  de nitrato de prata proporcionou aumento da frequência de formação de brotações (83,3%), quando comparado ao tratamento controle.

Tais trabalhos corroboram em relação à adição do nitrato de prata como um eficiente inibidor da ação do etileno, entretanto possuem discordância em relação à concentração adicionada ao meio de cultura, comprovando que a ação do nitrato de prata varia de espécie para espécie.

#### **4.3.2 Tipos de vedação no cultivo *in vitro* de brotações**

Para o teste de tipos de vedação foi observado que houve diferença significativa na variável comprimento do explante, o qual apresentou o melhor tratamento utilizando-se vedação de alumínio, com média de 1,8 cm, conforme pode ser observado na Figura 6 B. Em relação às variáveis, número de folhas verdes e número de folhas amarelas não houve diferença significativa entre os tratamentos para folhas verdes (Figura 6C). Entretanto na variável número de folhas amarelas foi possível observar que utilizando filme plástico e tampa de polietileno, as maiores médias obtidas foram 0,9 e 0,8, respectivamente (Figura 6 C).



**Figura 6** Aspecto dos explantes (A), comprimento do explante (B), número de folhas verdes e amarelas (C) e presença de raiz (D) de *V. quercifolia* cultivadas por 30 dias em meio MS, utilizando diferentes vedações. Barra = 1,0cm

Resultados semelhantes foram encontrados por Bandeira et al. (2007), o qual testando diferentes tipos de vedação no cultivo *in vitro* de *Thymus vulgaris* L., em que plantas cultivadas com filme plástico houve menor eficiência devido ao acúmulo de etileno no tubo de ensaio.

Para a variável presença de raiz, foi possível observar que houve maior presença destas no tratamento com vedação de algodão, tendo-se obtido 65% de explantes enraizados (Figura 6 D). Segundo Taiz e Zeiger (2009), o crescimento das raízes é promovido por concentrações baixas de etileno e inibido em concentrações mais elevadas deste gás. Este resultado corrobora com o obtido por Bandeira et al. (2007), em que obtiveram maior presença de raízes no tratamento com vedação com algodão.

O maior comprimento dos explantes cultivados com vedação com papel alumínio possivelmente apresentaram melhores resultados devido a menor incidência de luz, característica deste tipo de vedação, possivelmente ocorrendo o estiolamento do caule do explante, corroborando com as afirmações de Taiz e Zeiger (2009).

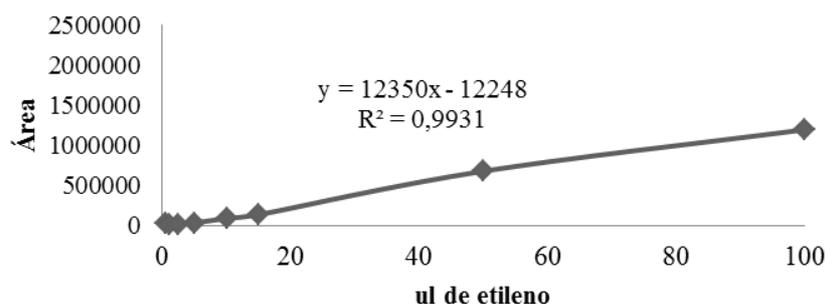
A utilização da vedação dos frascos com algodão proporcionou maior aeração no interior do frasco, permitindo maior troca gasosa entre o ambiente interno e o ar atmosférico. Já quando se utiliza papel alumínio, há a diminuição da incidência de luz no interior do tubo de ensaio e conseqüentemente o estiolamento do explante. Vedações herméticas como filme plástico, aumentam o acúmulo de etileno no interior do frasco. Este gás, produzido pelo metabolismo das plantas, cujas funções são consideradas reguladoras do seu crescimento, pode ser prejudicial à planta, quando produzido em excesso. Esta toxicidade leva ao desenvolvimento anormal das folhas conforme pode ser observado na figura 6A.

Estes resultados são semelhantes com os encontrados por Ribeiro et al. (2007), os quais realizaram o teste de diferentes vedações no cultivo *in vitro* de *Melissa officinalis* e os melhores resultados obtidos neste trabalho, foram utilizando o alumínio como tipo de vedação.

### 4.3.3 Quantificação do etileno *in vitro* por cromatografia gasosa

A espécie *V. quercifolia* apresenta senescência foliar, porém, o incremento de STS ou AgNO<sub>3</sub> reduz a ocorrência deste amarelecimento foliar. Estes autores estudaram diferentes concentrações de STS no meio de cultura MS com a espécie *V. quercifolia* cultivada *in vitro*.

Para quantificação do etileno durante o cultivo *in vitro* *V. quercifolia*, inicialmente construiu-se a curva padrão (Figura 7) com adições sucessivas de etileno, observando-se uma linear crescente entre a concentração e a área dos picos. Os valores obtidos na quantificação do etileno, em suas respectivas amostras, podem ser observados na Tabela 1.



**Figura 7** Curva analítica com adições sucessivas de etileno ( $\mu\text{L}$ )

**Tabela 1** Resultados das injeções das amostras de gás do interior dos frascos contendo explantes de *Vasconcellea quercifolia* em diferentes tratamentos

Amostra	Área	Concentração ( $\mu\text{L}$ )	%
MS (controle)	3607,60	0,005095	----
STS (inibidor)	2809,80	0,003968	22,12
ACC(precursor)	4958,05	0,007000	37,38

Portanto, a partir dos resultados obtidos, comprova-se a eficiência do tiosulfato de prata na inibição da síntese do etileno devido a sua alta mobilidade nos tecidos vegetais. A dissociação do complexo aniônico prata do STS

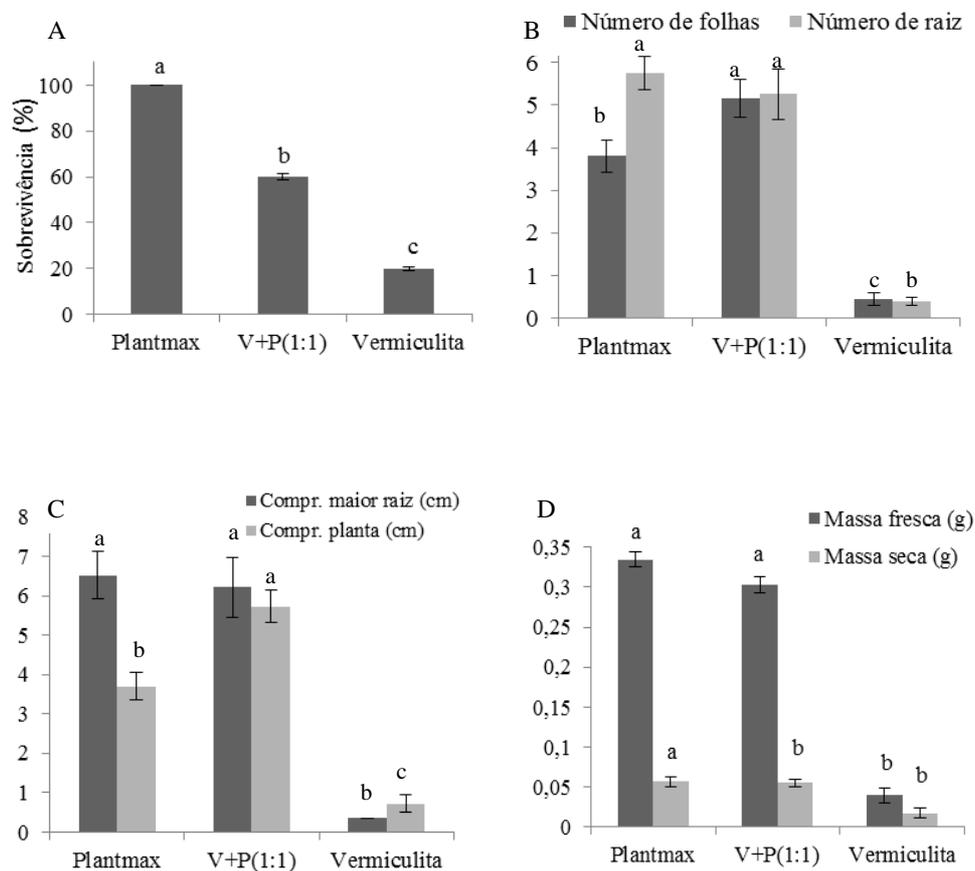
provavelmente precede sua interferência nos sítios de ligação do etileno (VEEN; OVERBEEK. 1989), promovendo a interrupção de sua ação, proporcionando um cultivo *in vitro* com maior eficiência da *Vasconcellea quercifolia* (Anexo1).

O tratamento suplementado com ACC apresentou 37,4% a mais de etileno quando comparado com o tratamento controle (somente com meio MS). Já o meio suplementado com STS apresentou 22,1% a menos de etileno que o tratamento composto apenas por meio MS.

Resultado semelhante foi encontrado em um estudo realizado com cana-de-açúcar, no qual foi utilizado ACC e AVG (aminoetoxivinilglicina, um inibidor da síntese do etileno), a fim de quantificar etileno, verificando-se menor quantidade deste hormônio no meio contendo AVG (MISHRA; NAILWAL, 2014). Desta forma, assim como no presente trabalho, estes autores comprovaram a ação do inibidor da síntese do etileno no cultivo *in vitro*.

#### **4.4 Aclimatização**

Na fase de aclimatização, foram observadas diferenças significativas em todos os parâmetros de crescimento analisados. Sendo a maior taxa de sobrevivência 93%, utilizando o substrato Plantmax (Figura 8 A). Esse resultado possivelmente ocorreu devido ao Plantmax apresentar vantagem pela sua uniformidade de composição química e física, diferentemente do que pode ocorrer com o solo e distintos materiais orgânicos, os quais podem variar muito nas suas características (SKREBSKY; NICOLOSO; MALDANER, 2006). Corroborando com o que foi observado no presente trabalho, estes autores durante a aclimatização de *Pfaffia glomerata*, concluíram que o substrato menos eficiente foi a vermiculita, sendo o Plantmax o mais recomendado.



**Figura 8** Sobrevivência (A), número de folhas e número de raiz (B), comprimento da maior raiz e comprimento da planta (C), massa fresca e massa seca (D) de *V. quercifolia* cultivadas por 30 dias em diferentes substratos.

Em relação ao comprimento da parte aérea (Figura 8C) e número de folhas (Figura 8B), as maiores médias ocorreram quando as plantas foram aclimatizadas em substratos de Vermiculita e Plantmax (1:1), 5,6 cm e 5,2 folhas, respectivamente. Plantas aclimatizadas na vermiculita apresentaram os menores valores para o número de raiz (Figura 8B). A vermiculita foi o substrato

menos eficiente, provavelmente devido aos grandes espaços existentes nesse material, o que dificulta a aderência do explante podendo causar a sua morte.

Estes resultados corroboram com os obtidos durante a aclimatização de plantas do porta-enxerto de macieira, em que Hoffmann et al. (2001) concluíram que o substrato menos eficiente foi a vermiculita, sendo o Plantmax o mais recomendado para o crescimento de raízes, entretanto em relação a parte aérea são discordantes, pois estes autores obtiveram melhor média de crescimento da plântula também utilizando somente Plantmax.

Em relação à massa fresca e seca, as plantas que permaneceram em substrato Plantmax e Vermiculita e Plantmax (1:1), apresentaram maiores médias (0,3; 0,05 e 0,31g respectivamente) (Figura 8). Estes resultados são concordantes com os encontrados na aclimatização de orquídeas, sendo a obtenção de melhores resultados quando foi utilizado o substrato Plantmax (VILLA et al., 2007). Assim como nas demais variáveis, a vermiculita apresentou a menor média, comprovando pouca eficiência deste substrato na aclimatização de *V. quercifolia*.

## 5 CONCLUSÃO

A utilização de embriões zigóticos mostrou-se mais eficiente no estabelecimento *in vitro* de *V. quercifolia*.

A adição de  $7,59 \mu\text{mol L}^{-1}$  de BAP é recomendada para multiplicação *in vitro*.

A vedação com papel alumínio é indicada no cultivo *in vitro*.

O  $\text{AgNO}_3$  mostrou-se eficiente na inibição do etileno, produzindo plantas com presença de raízes.

A quantificação de etileno por cromatografia gasosa confirmou a ação de STS como inibidor.

O substrato Plantmax® promoveu maior sobrevivência das plantas.

## REFERÊNCIAS

- BANDEIRA, J. M. et al. Diferentes tipos de vedações dos frascos e concentrações de sacarose na micropropagação de *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 472-474, 2007.
- CHENG, Z. L. et al. Its from the regulation of cytokinin biosynthesis by auxin response factor. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 161, n. 1, p. 240-251, Jan. 2013.
- COUTO, M.; OLIVEIRA, R. P.; FORTES, G. R. L. Multiplicação *in vitro* dos porta- enxertos de Prunus sp. 'Barrier' e 'Cadman'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 5-7, 2004.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Dordrecht: The Background, 2008. v. 1, p. 520.
- GERBER, T. et al. Efeito do Ácido Giberélico no potencial germinativo *in vitro* de sementes de Carica quercifolia (St. Hil.). Hieron. (Caricaceae) **Scientific Electronic Archives**, v. 5 p. 28-33, 2014.
- GIRIDHAR, P. et al. Silver nitrate influences *in vitro* shoot multiplication and root formation in *Vanilla planifolia* Andr. **Current Science**, Columbus, v. 81, n. 9, p.1166-1170, 2001.
- GOH, C. J. et al. The role of ethylene on direct shoot bud regeneration from magosteen (*Garcinia mangostana* L.) leaves cultured *in vitro*. **Plant Science**, Limerick, v. 124, p. 193-202, 1997.
- HOFFMANN, A. et al. Efeito de substratos na aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira "marubakaido". **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 2, p. 462-467, 2001.
- KINUPP, V. F.; LORENZI H., **Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2014. p. 768.

KONNO, K. et al. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **Plant Journal**, Oxford, n. 37, p. 370-378, 2004.

LIMA, C. S. M. et al. Influência de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aérea de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 669-671, 2007.

LOPES, A. W. P. et al. Estádio de maturação do fruto e uso do ácido Giberélico na germinação de sementes de mamoeiro. **Revista Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 30, p. 278-284, 2009.

MACHADO, A. A.; CONCEIÇÃO, A. R. **WinStat**: sistema de análise estatística para Windows: versão Beta. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2005.

MELO, A. P. C.; SELEGUINI, A. Estádio de maturação de frutos e remoção física da sarcotesta na produção de mudas de mamão. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v. 4, n. 1, p. 20-25, 2013.

MISHRA, S.; NAILWAL, R. C. Plant In vitro study of role of ethylene during tillering in sugarcane. **Sugar Tech**, Heidelberg, v. 3, n. 16, p. 255–263, 2014.

MUMO, N. N. et al. *In vitro* regeneration of selected Kenyan papaya (*Carica papaya* L.) lines through shoot tip culture. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 12, n. 49, p. 6826-6832, dez. 2013.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Arevised médium for rapid growth and biomassy with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-479, 1962.

NEPOMUCENO, C. F. et al. Controle da abscisão foliar e morfogênese *in vitro* em culturas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. cebil (Griseb) Altschul. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, n. 5, p. 967-975, 2007.

OZDEN-TOKATLI, Y. et al. *In vitro* response of pistachio nodal explants to silver nitrate. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 106, p. 415-426, 2005.

PASQUAL, M. et al. Indução de calos em anteras de café (*Coffea arabica* L.) cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, p. 71-76, 2002.

RIBEIRO, M. V. et al. Concentrações de sacarose e tipos de vedação no cultivo *in vitro* de *Melissa officinalis* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 843-845, jul. 2007. Supl. 2.

SAINI, S. et al. Auxin: a master regulator in plant root development. **The Plant Cell**, Rockville, v. 32, n. 6, p. 741-757, 2013.

SANTANA, J. R. F. et al. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L., I. Desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 80-86, 2008.

SANTOS-SEREJO, J. A. et al. Meios nutritivos para micropropagação de plantas. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 80-98.

SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J. Substratos na aclimatização de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen produzida *in vitro* sob diferentes doses de sacarose **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 5, p. 1416-1423, set./out. 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Viçosa, MG: UFV, 2009. 220 p.

TOKUHISA, D. et al. Compostos fenólicos inibidores da germinação em sementes de mamão (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 180-188, 2007.

TORRES, M. J. et al. Characterization of the proteolytic system present in *Vasconcellea quercifolia* látex, **Planta**, Berlin, v. 236 p. 1471-1484, 2012.

VEEN, H.; OVERBEEK, J. H. M. The action of silver thiosulphate in carnation petals. In: CLIJSTERS, H. (Ed.). **Biochemical and physiological aspects of ethylene production in lower and higher plants**. Dordrecht: Kluwer, 1989. p. 109–117.

VIDAL, F. R.; DINIZ, J. D. N.; SILVA, F. P. Multiplicação *in vitro* de plantas juvenis de mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 1, p. 64-70, jan./mar. 2013.

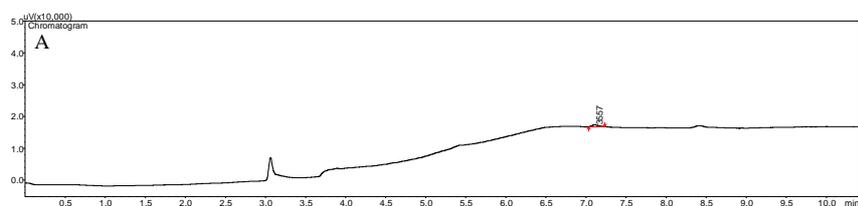
VILLA, F. et al. Influência de substratos alternativos na aclimatização de orquídeas. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 54, n. 316, nov./dez. 2007. p. 501-505.

## ANEXO

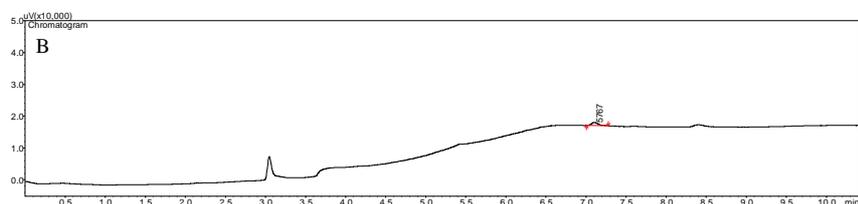
### Cromatogramas

#### Quantificação do etileno *in vitro* por Cromatografia Gasosa

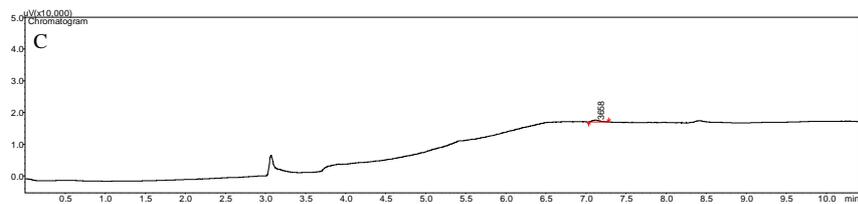
Os cromatogramas referentes à quantificação de etileno com brotações de *Vasconcellea quercifolia* cultivadas *in vitro* podem ser observados nas Figuras 1, 2 e 3.



7.106 3556.9

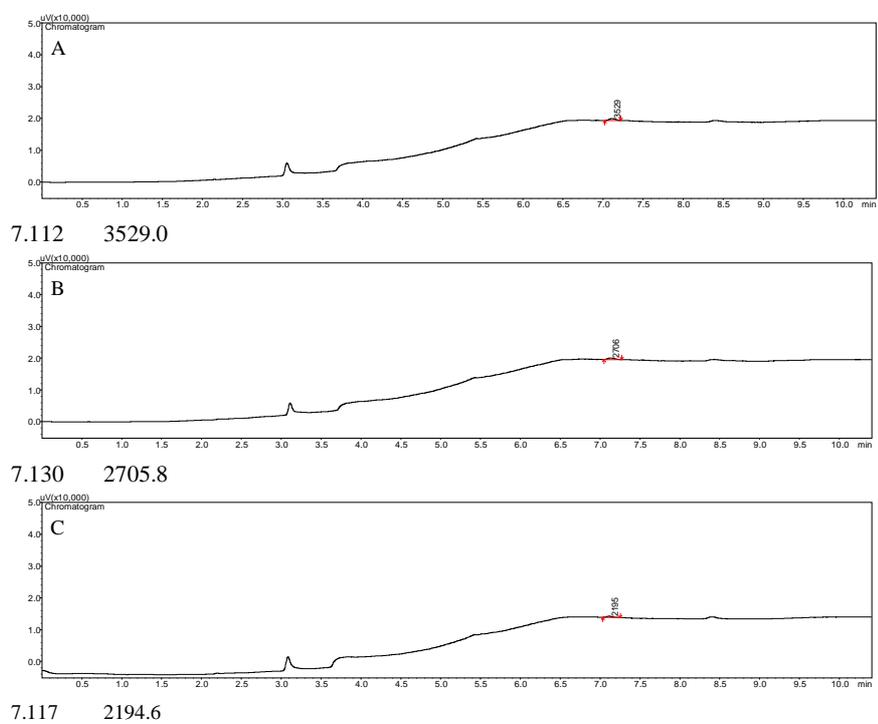


7.103 5766.5

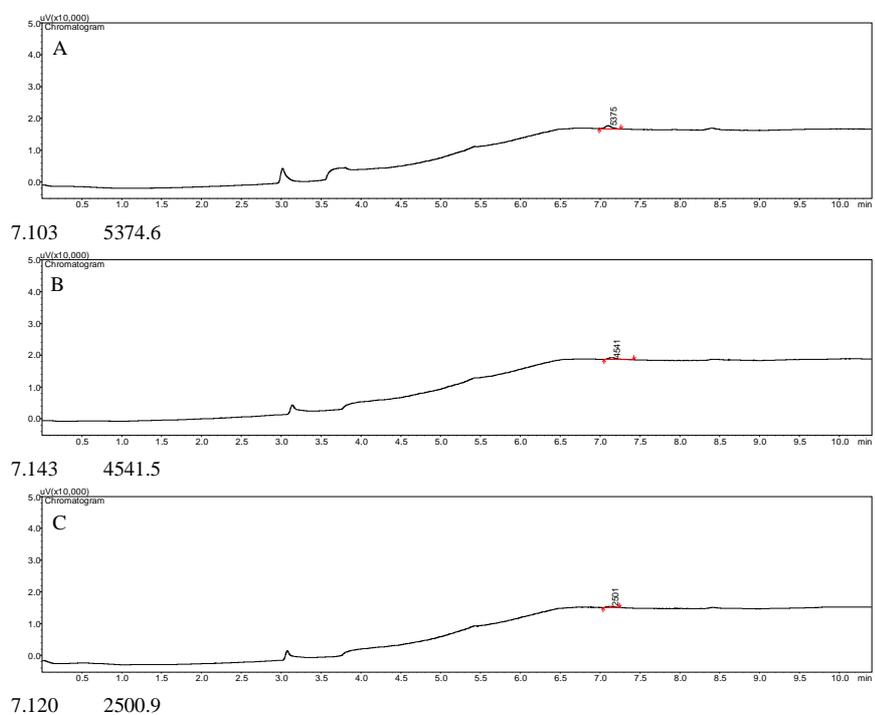


7.118 3658.3

**Figura 1** Cromatogramas das análises das amostras do gás etileno provenientes do cultivo *in vitro* de *Vasconcellea quercifolia* em meio MS (A), onde B e C são repetições das análises



**Figura 2** Cromatogramas das análises das amostras do gás etileno provenientes do cultivo *in vitro* de *Vasconcellea quercifolia* em meio MS adicionado de STS (A), onde B e C são repetições das análises



**Figura 3** Cromatogramas das análises das amostras do gás etileno provenientes do cultivo *in vitro* de *Vasconcellea quercifolia* em meio MS adicionado de ACC (A), onde B e C são repetições das análises

## **CAPÍTULO 2**

**Influence of Silver Thiosulfate Ethylene Inhibitor on *in vitro* Growth of  
*Vasconcellea quercifolia* A. St.-Hil. Shoots**

**Aceito para publicação na Revista “*Acta Horticulture*”**

## ABSTRACT

The *Vasconcellea quercifolia* A. St.-Hil. is a native species, belonging to Caricaceae family, which is resistant to Papaya Ringspot Virus that can be used in plant breeding programs for commercial papaya varieties. The objective of this study was to investigate the influence of silver thiosulfate (STS), an inhibitor of ethylene action, during the *in vitro* growth of *Vasconcellea quercifolia* shoots. Shoots around two inches long were inoculated on MS medium supplemented with 20 g L<sup>-1</sup> sucrose, 10 ppm ascorbic acid, 0.1 µM BA and 1µM IAB. The STS was filter-sterilized and different concentrations (0, 0.1, 1, 10 and 100 µM) were added to the autoclaved medium. Each treatment consisted of 10 replicates and the experiment was performed in duplicate. After 30 days of culture in a growth chamber, the following parameters were evaluated: (i) intensity of callus formation, (ii) number of green leaves, (iii) number of leaves showing chlorosis, (iv) explant length, (v) number and (vi) root length. The use of STS was statistically significant regarding callus formation at the shoots base, shoot length, number of green leaves, number of roots and root length. Higher callus formation was observed in the absence of STS. Longer explants (23 and 18 mm) were observed in the absence or presence of 0.1 µM STS, respectively. The highest STS concentration (100 µM) caused a reduction in the number of green leaves. The use of 0.1 and 1 µM STS showed better results for number of root (3.8 and 2.3) and root length (67 and 49 mm), respectively. The results show that ethylene interferes in the *in vitro* growth of *Vasconcellea quercifolia* shoots.

**Keywords:** *Native species, STS, plant tissue culture, in vitro rooting, calli inhibition.*

## INTRODUCTION

Papaya (*Carica papaya* L.), a native species from Central America, is a fast-growing arborescent herb. Dioecious and hermaphrodite cultivars are grown in many tropical and subtropical countries due to their vitamin rich fruits and their rich papain latex (Drew *et al.* 2006). Papaya is the best known member of the family Caricaceae that consists of five genera: *Carica*, *Jacaratia*, *Jarilla*, *Cylicomorpha* and *Vasconcellea* (Badillo, 2000). *Vasconcellea* species have been related to be resistant to Papaya Ringspot Virus form P (PRSV-P) in many countries (Drew *et al.* 2006).

There are many diseases of papaya that are considered economically important, however, the most devastating is PRSV-P. Besides diseases, papaya also suffers from negative effects of ethylene, such as loss of color green, premature wilting (Drew *et al.* 2005), abscission of flowers and leaves and accelerated senescence (Banks, *et al.* 2011), reducing the commercial value of the fruits.

Silver ion has been used as a non-competitive inhibitor of ethylene action (Knee, 1992). It is believed that silver ions act on thiol groups of some plant cell wall protein or receptor protein located on the outer surface of the plasma membrane, or on proteins that are involved in signal transduction, suppressing the action of the gas and therefore, increasing the organs longevity (Binder *et al.*, 2007; Taiz and Zeiger, 2009).

The objective of this study was to investigate the influence of silver thiosulfate (STS), an inhibitor of ethylene action, during the *in vitro* growth of *Vasconcellea quercifolia* shoots.

## MATERIALS AND METHODS

Nodal segments of approximately 1.0 cm in length, containing one axillary bud, from plants of *Vasconcellea quercifolia* were used.

Explants were inoculated on MS medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with sucrose 20 g L<sup>-1</sup> sucrose and solidified with 7 g L<sup>-1</sup> agar with the pH adjusted to 5.8 prior sterilization.

In a laminar air flow bench, the STS was filter-sterilized and added in different concentrations (0, 0.1, 1, 10 and 100 µM) to the medium. After inoculation, the explants were maintained in a growth room chamber for 30 days with 16 hours photoperiod under 36 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> irradiance and 25 ± 2 °C temperature. After this period the following parameters were evaluated: (i) the intensity of callus formation, (ii) number of green leaves, (iii) number of leaves showing chlorosis, (iv) explant length, (v) number and (vi) root length.

For each treatment ten replicates were used, each one containing five tubes and in each tube was inoculated one nodal segment per tube. Data were subject to ANOVA using the WinStat 2.0 software and the averages were compared using the Tukey test ( $P \leq 0.05$ ).

## RESULTS AND DISCUSSION

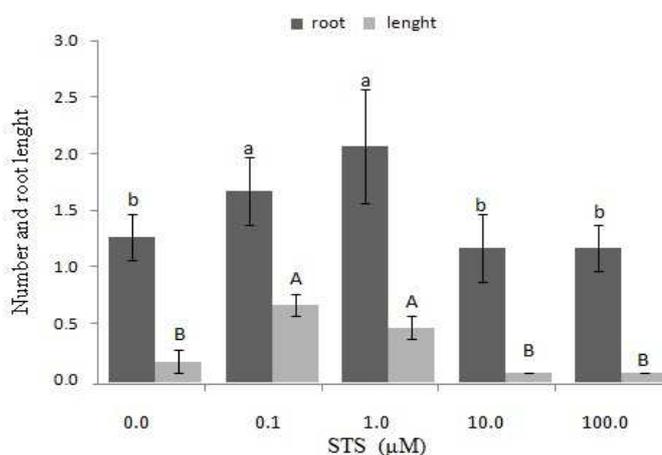
The use of STS was statistically significant regarding callus formation at the shoots base ( $p < 0.0001$ ), shoot length ( $p < 0.0001$ ), number of green leaves ( $p = 0.0231$ ), number of roots ( $p < 0.0001$ ) and root length ( $p < 0.0001$ ). Higher callus formation was observed in the absence of STS. Longer explants (23 and 18 mm) was observed in the absence or presence of 0.1  $\mu\text{M}$  STS, respectively. The highest STS concentration (100  $\mu\text{M}$ ) caused a reduction in the number of green leaves (Table 1).

**Table 1** Shoot length (SL) at the shoots base, number of green leaves (NGL) and callus formation (CF) of *Vasconcellea quercifolia* at different STS concentration after 30 days of culture

STS ( $\mu\text{M}$ )	SL (cm)	NGL	CF
0.0	2.3 $\pm$ 0.3 a	2.4 $\pm$ 0.2 ab	2.7 $\pm$ 0.3 a
0.1	1.6 $\pm$ 0.1 bc	2.6 $\pm$ 0.2 a	1.0 $\pm$ 0.2 b
1.0	1.7 $\pm$ 0.1 ab	2.6 $\pm$ 0.2 ab	1.5 $\pm$ 0.2 b
10.0	1.0 $\pm$ 0.1 cd	1.8 $\pm$ 0.2 ab	1.6 $\pm$ 0.2 b
100.0	0.9 $\pm$ 0.1 d	1.7 $\pm$ 0.2 b	0.8 $\pm$ 0.1 b

Averages ( $\pm\text{SE}$ ) for each treatment is compared on the column. Mean with the same letters are not statistically different according to the Tukey

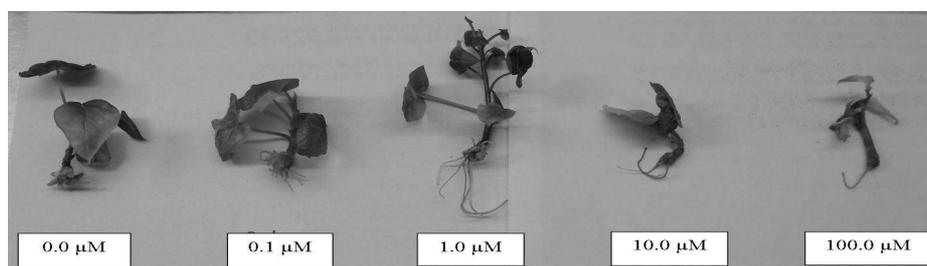
The use of 0.1 and 1.0  $\mu\text{M}$  STS increased the number of roots (3.8 and 2.3) and root length (67 and 49 mm), respectively (Figure 1).



**Figure 1** Number of root and root length of *Vasconcellea quercifolia* according to different STS concentration. Bars ( $\pm$ SE) with the same letters are not different according to Tukey test.

The silver thiosulphate (STS), a more mobile form of the silver ion, has its mechanism of action based in binding of the ions silver to proteins that bind to ethylene (EBPs), the presumed receptor for ethylene (Kumar and Ravishankar, 2007).

Contrary to that observed Pereira-Netto and McCown (1999) on *Hancornia speciosa*, where the use of a high STS concentration (5 mM) induced significant increase in the average number of lateral branches, we observed that 100  $\mu$ M STS promoted a toxic effect on the shoots (Figure 2; Table 1).



**Figure 2** Explants of *Vasconcellea quercifolia* after 30 days exposed to different STS concentration.

Ethylene is capable of inducing adventitious root formation on leaves, stems, floral stalk and even other roots, however, the production and action of the gas that directly affect the response of the explant is positive or negative, thereby, the environment in which the explants are subjected, provides, in general, the accumulation of ethylene (NEPOMUCENO *et al.* 2007; CHAE *et al.* 2012). Therefore the increase of 0.1 and 1.0  $\mu\text{M}$  of STS to the culture medium was statistically better than the other treatments, with the absence of ethylene and exceeded these concentrations (10 and 100 $\mu\text{M}$ ), since it reduced the synthesis of the hormone and consequently the accumulation in the microenvironment.

According to Souza *et al.* (2008), the microenvironment within the culture flasks appears to be a homogeneous, but it is actually the one responsible for the variability in the behavior of cultures. In this context, the absence of STS may have promoted lower number and length of roots due to the high concentration of ethylene.

**LITERATURE CITED**

BADILLO VM. 2000. *Carica L.* vs. *Vasconcella* St. Hil. (Caricaceae): con la rehabilitacion de este ultimo. *Ernstia* 10:74–79.

BANKS, J.A., Nishiyama, T., Hasebe, M. *et al.* 2011. The Selaginella genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science*. 332: 960–963.

BINDER, B.M., Rodriguez, F.I., Bleecker, A.B., and Patterson, S.E. 2007. The effects of Group 11 transition metals, including gold, on ethylene binding to the ETR1 receptor and growth of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 581: 5105–5109.

CHAE, S.C., KIM, H. H., PARK, S.U. 2012. Ethylene Inhibitors Enhance Shoot Organogenesis of Gloxinia (*Sinningia speciosa*). *The Scientific World Journal*. 4: 1725-1728

DREW, R., PERSLEY, D., O'BRIEN, C., Bates on, M. 2005. Papaya ringspot virus in Australia and the development of virus resistant plants. *Acta Horticulturae* 692: 101-106.

DREW RA, SIAR SV, O'BRIEN CM, MAGDALITA PM, SAJISE AGC. 2006. Breeding for papaya ringspot virus resistance in *Carica papaya* L. via hybridisation with *Vasconcella quercifolia*. *Aust J Exp Agric* 46: 413–418.

V. KUMAR, A. RAMAKRISHNA, AND G. A. RAVISHANKAR. 2007. “Influence of different ethylene inhibitors on somatic embryogenesis and secondary embryogenesis from *Coffea canephora* P ex Fr,” *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 6: 602–607.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.

NEPOMUCENO, C.F. *et al.* 2007. Controle da abscisão foliar e morfogênese in vitro em culturas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul. *Revista Árvore*. 5: 967-975.

NICHOLS, R., KOFRANEK, A. M, KUBOTA, J. 1982. Effect of delayed silver thiosulphate pulse treatments on carnation cut flower longevity. *HortScience*, 17:600-601.

PEREIRA-NETTO, A.B.; McCOWN, B.H. 1999. Thermally and chemically-induced changes in shoot morphology of *Hancornia speciosa* microcultures: evidence of mediation by ethylene. *Tree Physiology*, Victoria-Canada. 19: 733-740.

PINHAL, H. F.; ANASTÁCIO, M. R.; CARNEIRO, P. A. P.; SILVA, V. J.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. 2011. Aplicações da cultura de tecidos de tecidos em fruteiras do Cerrado. *Ciência Rural*. 7: 1136-1142.

SISLER, E.C. 1991. Ethylene-binding components in plants. In: MATTO, A.K.; SUTLE, J.C. (Ed.). *The plant hormone ethylene*. Boca Raton. 81-99.

SOUZA, J.A.; DONINI, L.P.; SILVA, L.C.; CORRÊA, M.G.S.; SCHUCH, M.W. 2007. Enraizamento in vitro do porta-enxerto de macieira M-9 em função da vedação, sacarose e material de suporte do meio de cultura. *Scientia Agraria*. 2: 161-164.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2009. *Fisiologia Vegetal*. 4ª edição. Porto Alegre: Artmed, 848p.

### **CAPÍTULO 3**

**Criopreservação de embriões zigóticos de *Vasconcellea quercifolia*  
utilizando a técnica de desidratação em fluxo laminar**

**Revista Acta Horticulture**

## RESUMO

*Vasconcellea quercifolia* A. St. Hill (Caricaceae) é uma espécie com potencial ecológico, medicinal, nutricional e comercial. O objetivo neste estudo foi investigar o efeito da desidratação em câmara de fluxo laminar na criopreservação de *Vasconcellea quercifolia*. Para a curva de desidratação e germinação após desidratação em fluxo laminar foram estudados nove períodos de desidratação (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 e 300 minutos). A germinação *in vitro* foi realizada em meio MS. Para a aclimatização foi utilizado o substrato comercial Plantmax<sup>®</sup> com cobertura de plástico, após 30 dias foi realizada avaliação da taxa de sobrevivência. Na criopreservação foram estudados quatro períodos de desidratação (0, 30, 60 e 120 minutos) e após a avaliação, o material sobrevivente foi aclimatizado. Os dados foram analisados pelo software STATISTICA 2.0 e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). O tempo de secagem do embrião afetou o desenvolvimento das plantas. A desidratação acima de 180 minutos mostrou uma redução significativa em todos os parâmetros avaliados. A partir de 240min de desidratação, houve 80% de sobrevivência na aclimatização e no tratamento subsequente com 70% em 300min de desidratação. O tratamento com 30 minutos de desidratação apresentou melhor resultado na criopreservação. Todos os sobreviventes da criopreservação aclimatizaram.

Palavras-chave: Conservação *in vitro*. Aclimatização. Mamãozinho-do-mato.

## 1 INTRODUÇÃO

A espécie *Vasconcellea quercifolia*, conhecida popularmente como mamãozinho-do-mato é um fruto alimentício, conhecido pelos botânicos como planta espontânea, possuindo importância econômica e ecológica (KINUPP; LORENZI, 2014). Embora utilizados por uma pequena parte da população, estes frutos apresentam grande potencial nutricional. Além disso, esta espécie possui importância comercial, sendo utilizada principalmente na indústria têxtil, farmacêutica, cosmética e alimentar, possuindo ainda, altas concentrações de potássio, o qual se apresenta eficaz para a produção de alimentos dietéticos (GALINDO-ESTRELLA et al., 2009).

A partir de *Vasconcellea quercifolia* é possível realizar a extração da enzima proteolítica papaína, a qual apresenta grande potencial de utilização na indústria alimentar como amaciante de carne e clarificador de cerveja. Estudos recentes relatam alta atividade proteolítica do látex de *Vasconcellea quercifolia* em comparação com o látex de *Carica papaya* (TORRES et al., 2012).

Desta forma, assim como outras espécies nativas do Brasil, a *V. quercifolia* poderá perder espaço para a expansão da monocultura agrícola. Por esta razão, os estudos para a multiplicação e conservação de *V. quercifolia* apresentam-se como uma ferramenta extremamente importante para garantir a sobrevivência desta espécie.

A conservação de plantas pode ser realizada por meio da proteção do habitat natural (*in situ*) ou pelo crescimento de plantas no campo de amostragem (ENGELMANN, 2011; GONZÁLEZ-BENITO; MARTIN; VIDAL, 2009). Estes dois métodos de conservação de germoplasma são onerosos e impedem a troca de material, devido ao risco de contaminação, e conseqüentemente o desenvolvimento de doenças (ENGELMANN, 2011), ataque de pragas e desastres naturais (GONZÁLEZ-BENITO et al., 2005).

Tais desvantagens tornam a micropropagação uma alternativa viável, possuindo maior capacidade propagativa, melhorias no corte devido ao

rejuvenescimento *in vitro* de plantas reproduzidas em ambiente asséptico e livre de patógenos (ANDREU; MARIN, 2005). Além disso, a utilização deste método possibilita a obtenção de um maior número de plantas em um curto período de tempo, ocupando uma área física menor em comparação com os métodos convencionais de multiplicação.

Assim, é possível salientar que a micropropagação possui alta eficiência para a obtenção de plantas, entretanto, para o quesito conservação a longo prazo, a melhor alternativa é a criopreservação. Nos últimos anos, esta tem representado uma das técnicas mais promissoras para armazenamento seguro (ENGELMANN, 2004; NNAN et al., 2012). Sendo ainda esta técnica uma alternativa para a conservação de muitas espécies, em que cada material biológico requer um protocolo específico (PANIS; LAMBARDI, 2005; SAKAI; HIRAI; NIINO, 2008).

A criopreservação caracteriza-se pela conservação de estruturas vegetais, como embriões zigóticos ou eixos embrionários, em temperaturas ultrabaixas. Contudo, antes da criopreservação é essencial a remoção da água para a prevenção de lesões durante o esfriamento, assim como para a manutenção da viabilidade pós-reaquecimento. A desidratação pode ser obtida a partir de câmara de fluxo laminar, sílica gel, congelamento lento, pela aplicação de substâncias penetrantes crioprotetoras ou por meio da utilização de técnicas pré-estabelecidas (ENGELMANN, 2011; PANIS; SWENNEN, 2005). A remoção de água é um processo extremamente essencial à técnica de criopreservação, pois, durante o reaquecimento, pode ocorrer a formação de cristais de gelo a partir do líquido intracelular, conduzindo o material vegetal à morte celular por meio de um processo de cristalização ou de recristalização (MAZUR, 1984).

Ainda não foram realizados estudos sobre criopreservação de *V. quercifolia*. Desta forma, objetivou-se neste trabalho desenvolver um protocolo de criopreservação de embriões zigóticos de *Vasconcellea quercifolia*, visando a sua conservação.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Germinação

Para a germinação *in vitro*, foi realizado experimento de teor de água, germinação e aclimatização comparando diferentes períodos de desidratação.

#### 2.1.1 Material vegetal

Frutos imaturos de *V. quercifolia* (Figura 1A) foram coletados no município de Lavras, no sul de Minas Gerais, Brasil (21° 14 'S e 45° 00' W Gr. e 918 m de altitude). Os frutos foram colhidos, lavados e levados para a câmara de fluxo laminar, onde foram imersos em álcool 70% v / v durante um minuto, em seguida foram colocados em uma solução de hipoclorito de sódio 1% de cloro ativo por 10 minutos e então, lavados três vezes em água estéril. Após a assepsia os frutos foram despulpados e as sementes (Figura 1B) foram imersas em álcool 70% v/v por 30 segundos e posteriormente, imersas em uma solução de hipoclorito de sódio com 1% de cloro ativo por cinco minutos. Após a desinfestação, os embriões foram excisados (Figura 1C).



**Figura 1** Fruto imaturo (A), semente (B) e embrião zigótico (C) de *Vasconcellea quercifolia*. Barra = 0,5 cm (A), 0,5 cm (B), 0,1cm (C)

### 2.1.2 Teor de água

Os embriões zigóticos foram colocados sobre papel filtro em placa de Petri e então foi verificado o peso fresco inicial de dez embriões. Em seguida foi realizada a desidratação em fluxo laminar nos períodos de 0, 30, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos a 25 °C, a partir de então, os embriões foram completamente secos em estufa a 70 °C durante 72 horas. Os teores de água foram expressos em porcentagem.

### 2.1.3 Germinação

Os embriões zigóticos excisados e desidratados em câmara de fluxo laminar por diferentes tempos (0, 30, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos) foram inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado em 7g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 e em seguida realizou-se a autoclavagem a 121 °C durante 20 minutos. O material foi mantido em câmara com ausência de luz durante sete dias consecutivos, após esse período foram transferidos para sala de crescimento a 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo luminoso de 36 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> por 45 dias. Para cada tratamento foram utilizadas três repetições com dez embriões por placa de Petri. Após 30 dias avaliou-se: germinação (%), número de folhas verdes, o comprimento da plântula (cm), o número de raízes e comprimento da maior raiz (cm).

### 2.1.4 Aclimatização

Plantas oriundas do processo de germinação (dez plantas de cada tratamento) foram transferidas para tubetes com substrato comercial Plantmax<sup>®</sup> com cobertura de saco plástico transparente. As plantas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura média de 25 ± 2°C. Nas duas primeiras semanas foram realizados cortes laterais do saco plástico, e na terceira semana toda a parte superior foi retirada. Após 30 dias foram avaliados, sobrevivência, o número de folhas e de raízes, o

comprimento das plantas (cm), o comprimento da raiz principal (cm) e o peso fresco e seco (mg).

## 2.2 Criopreservação

Embriões zigóticos (30 por tratamento) foram extraídos de frutos imaturos e desidratados nos períodos de 0, 30, 60 e 120 minutos, conforme descrito no tópico 1.3. Os embriões foram colocados em criotubos de 2 ml com uma gota de PVS2 (*Plant Vitrification Solution 2*), solução composta por 30% de glicerol (p/v), 15% de etileno glicol (p/v) e 15 % de DMSO (p/v) (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990). Em seguida, foram imersos em Nitrogênio Líquido (NL) por 30 minutos. Os materiais foram reaquecidos em solução de descarregamento (solução de 0,4 mol L<sup>-1</sup> de sacarose em meio MS) por 45 minutos em temperatura ambiente. Após o reaquecimento, os embriões criopreservados foram inoculados em meio MS suplementado com sacarose (0,3 mol L<sup>-1</sup>) durante 24 h, e mantido em sala com ausência de luz, em seguida foram transferidos para o meio MS suplementado com sacarose (0,09 mol L<sup>-1</sup>) e mantidos na ausência de luz por seis dias. Após este período, os embriões foram transferidos para a luz em um fotoperíodo de 16 h, a 25 ± 2 °C e densidade de fluxo luminoso de 36 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> por 30 dias. Os parâmetros avaliados foram porcentagem de embriões germinados e regenerados. Após a avaliação, os melhores resultados foram aclimatizados de acordo com a metodologia de aclimatização descrita no tópico 1.3.1.

## 2.3 Análise estatística

O delineamento foi inteiramente casualizado e os dados foram submetidos à análise de variância, as médias quantitativas foram analisadas por regressão e as qualitativas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância, utilizando o software estatístico (Statsoft).

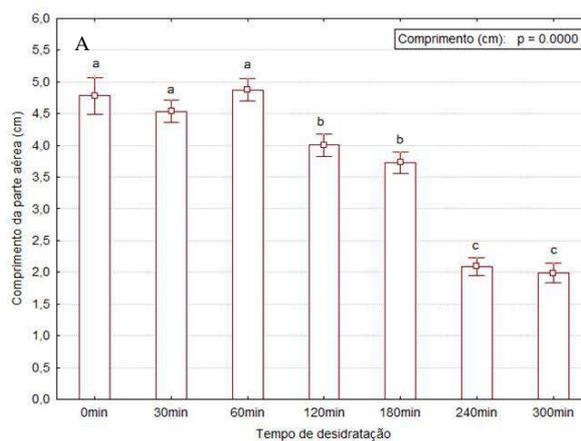
### 3 RESULTADO E DISCUSSÃO

#### 3.1 Teor de água

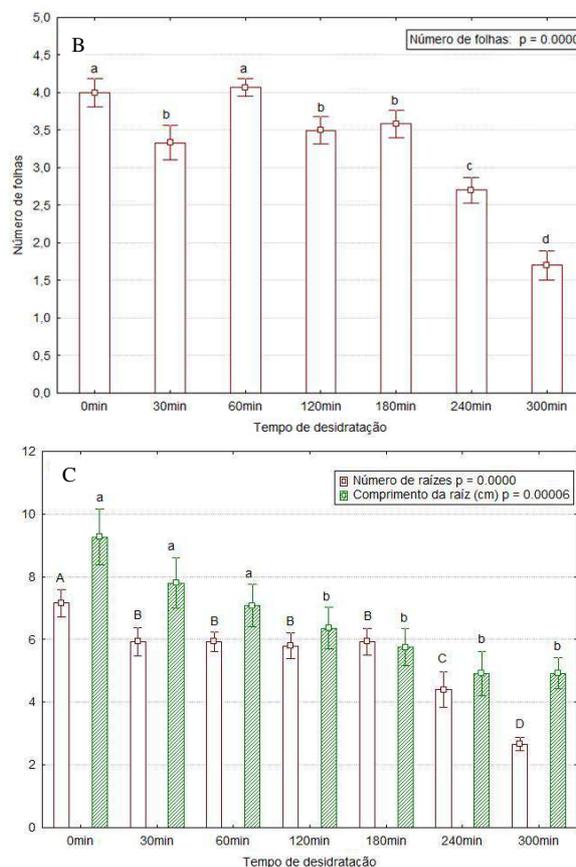
Os embriões zigóticos demonstraram um teor inicial de água de 91% e a partir de 30 minutos de desidratação não houve queda significativa no teor de água permanecendo 88%. Este alto teor de água pode ser explicado pelo grau de maturidade a qual se encontrava os frutos (imaturos), pois a perda de água e o teor de água inicial variam de acordo com a maturidade dos frutos e sementes, sendo os frutos imaturos com maior teor de água (BLACK; OBENDORF; PRITCHARD, 2002). No presente trabalho, a escolha de frutos imaturos, ocorreu devido à maior facilidade de excisão dos embriões.

#### 3.2 Germinação

Após 45 dias de cultivo *in vitro* dos embriões zigóticos, foi observado que os diferentes tempos de desidratação em câmara de fluxo laminar afetaram o desenvolvimento das mudas de *V. quercifolia*, porém, houve alta taxa de germinação. Com o aumento do período de desidratação observou-se um decréscimo nas médias das variáveis avaliadas (Figura 2).



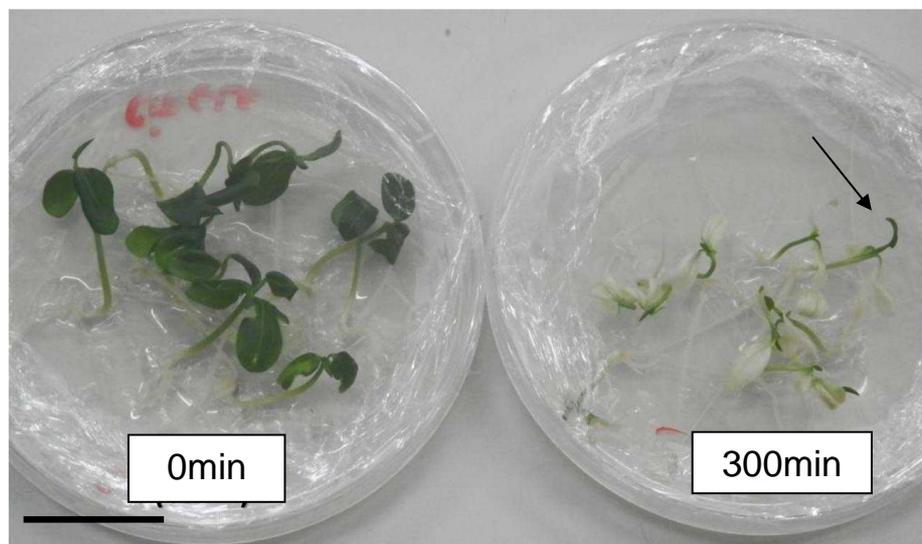
Continuação...



**Figura 2** Comprimento da parte aérea (A), número de folhas (B), número de raízes e comprimento de raízes (C) de embriões de *V. quercifolia* germinados em diferentes períodos de desidratação em câmara de fluxo laminar

Observou-se também que o número de folhas foi afetado pelo aumento do tempo de desidratação (Figura 2B). Os períodos acima de 180 minutos causaram a diminuição do número de folhas (Figura 3). Em relação ao número médio de raízes formadas, o tempo de até 120 minutos de desidratação apresentaram melhor formação destas (Figura 2C). Resultado discordante foi obtido com embriões da espécie *Byrsonima intermedia* no qual períodos acima de 240 min de desidratação em fluxo laminar não diminuíram a porcentagem de

germinação (SILVA et al., 2014). Em contraste com os resultados encontrados por esses autores, observou-se um decréscimo em todos os parâmetros avaliados, mostrando uma maior sensibilidade desta espécie.



**Figura 3** Comparação entre embriões de *Vasconcellea quercifolia* que não foram desidratados e embriões que foram desidratados por 300 minutos em câmara de fluxo laminar após 15 dias. Seta indicando a região apical da plântula. Barra = 3,0 cm

Os embriões expostos aos maiores períodos em câmara de fluxo laminar (a partir de 180 minutos) apresentaram plantas com desenvolvimento anormal.

Apesar da perda de água ao longo dos 300 minutos não ser estatisticamente significativa (3,3%), verificou-se que, devido ao alto conteúdo de água inicial (91%) e à imaturidade dos embriões, esta perda de água é um fator relevante.

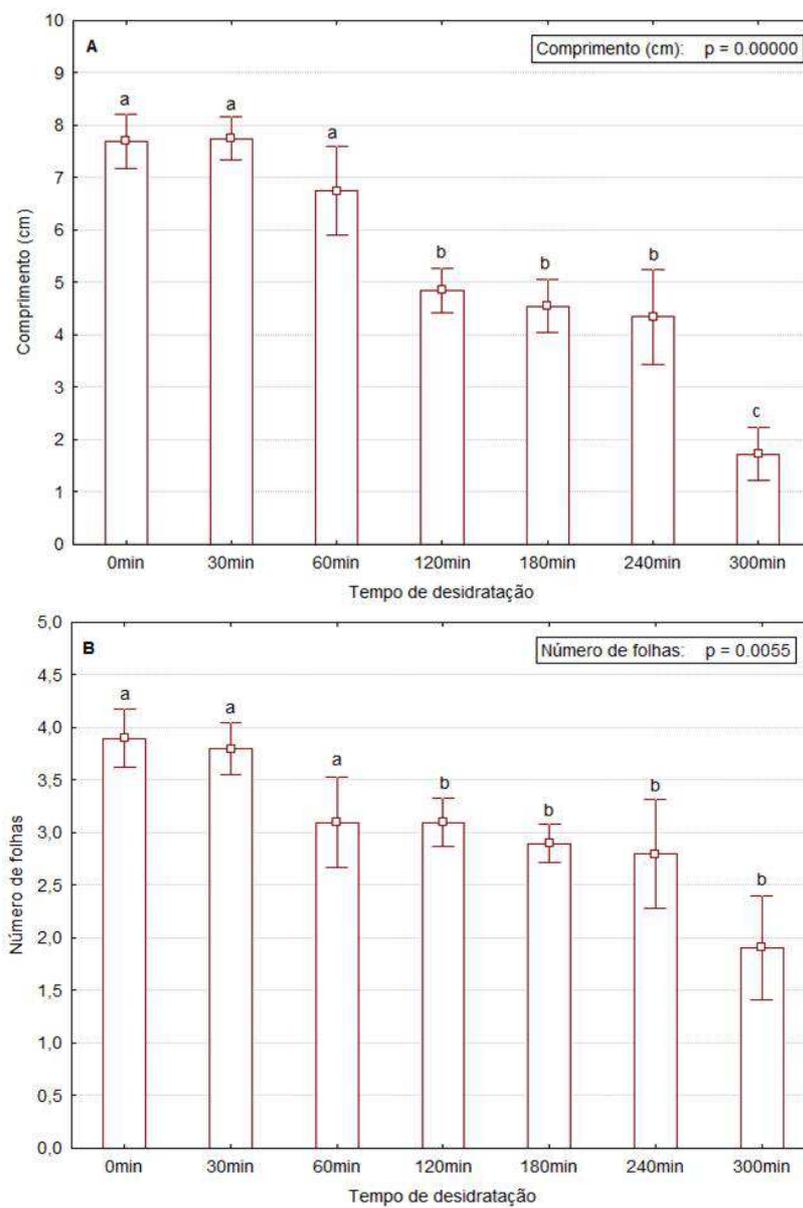
Conforme pode ser observado na figura 3, as plantas provenientes de embriões zigóticos expostos por 300 minutos em câmara de fluxo laminar, apresentaram folhas menores e esbranquiçadas, diferentemente das plantas não desidratadas (controle). Entretanto, na região meristemática não foi observada

anormalidade constatando-se que os cotilédones podem ter protegido a região meristemática durante a exposição em câmara de fluxo laminar.

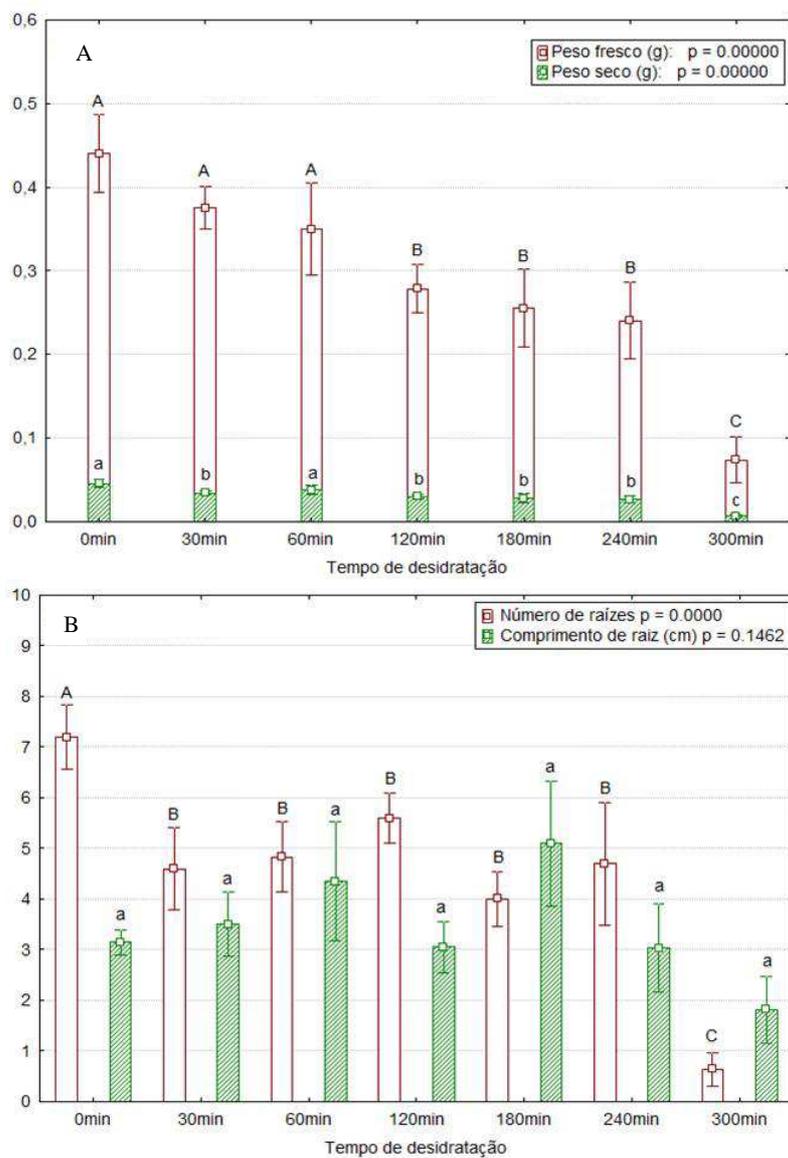
Além disso, a perda de água durante a desidratação dos embriões zigóticos provavelmente não afetou a região meristemática devido à presença de apenas microvacúolos, visto que estes são responsáveis por armazenar a maior parte da água presente nas células (TAIZ; ZEIGER, 2009).

### **3.3 Aclimatização**

Após 30 dias de aclimatização todas as plantas aclimatizadas sobreviveram, entretanto as plantas oriundas de embriões que não foram desidratados apresentaram melhor crescimento após aclimatização. De modo geral, os tratamentos com 30, 60 e 120 minutos de desidratação apresentaram os melhores resultados para todas as variáveis analisadas. Em relação ao comprimento da parte aérea, os tratamentos de 30 e 60 minutos apresentaram melhores resultados, 7,8cm e 6,8cm, respectivamente (Figura 4A). Quanto ao número de folhas, o tratamento de 30 minutos (Figura 4B) foi o melhor, apresentando como média 3,9 folhas, em relação ao número e comprimento de raízes 30, 60, 120 minutos foram os melhores tratamentos tendo como médias (5B).



**Figura 4** Comprimento da parte aérea (A) e número de folhas (B) de plantas aclimatizadas de *Vasconcellea quercifolia* oriundas de embriões desidratados em diferentes períodos em câmara de fluxo laminar



**Figura 5** Após aclimatização: peso fresco e peso seco (A), número de raízes e comprimento de raiz (B) de plantas aclimatizadas de *Vasconcellea quercifolia* oriundas de embriões desidratados em diferentes períodos. de plantas de *Vasconcellea quercifolia*

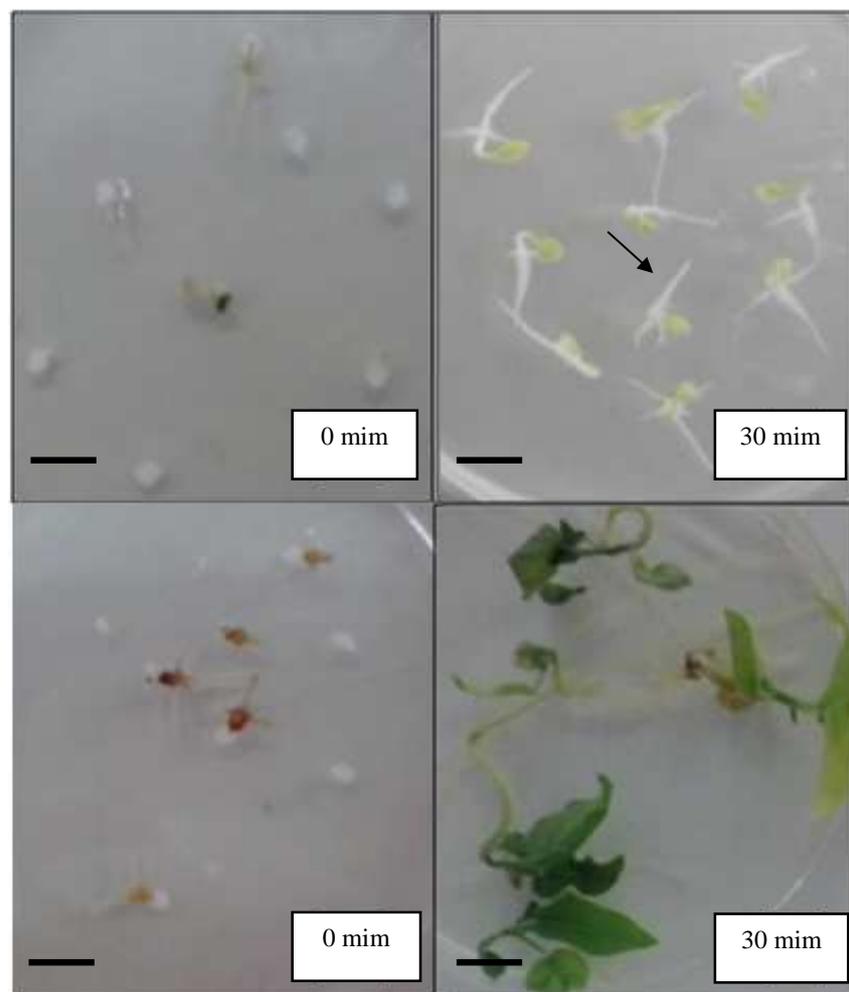
### 3.4 Criopreservação

A maior taxa de sobrevivência foi observada no tratamento que os embriões foram criopreservados após a desidratação por 30 minutos em câmara de fluxo laminar, resultando na taxa de sobrevivência de 53% (Tabela 1). A falta de germinação em alguns embriões criopreservados pode estar associada à inviabilidade dos cotilédones e plúmula, como hipocótilos e radículas (WEN; WANG, 2010).

**Tabela 1** Porcentagem de plantas de *Vasconcellea quercifolia* que sobreviveram à criopreservação (direita) e aclimatização após criopreservação (esquerda) em diferentes períodos de desidratação

Tempos de desidratação (min)	Criopreservação	Aclimatização
	Plantas (%)	Plantas (%)
0	0	0
30	53	53
60	10	10
120	3	3

Como pode ser observado na Figura 5 após 15 e 30 dias, o único tratamento que não foi desidratado antes da criopreservação (controle) não revelou qualquer sobrevivente havendo um pouco da radícula desenvolvida. Nos outros tratamentos (30, 60 e 120 minutos), a radícula desenvolveu e após, gradualmente, a parte aérea em alguns embriões. O tempo de desidratação mais elevado mostrou desenvolvimento lento da parte aérea, e também menor coloração verde do caule e folhas.



**Figura 6** Retomada do desenvolvimento dos embriões de *Vasconcellea quercifolia* desidratados por diferentes períodos e criopreservados após 15 (acima) e 30 (abaixo) dias após a criopreservação. Barra = 0,3 cm

Plantas provenientes de embriões desidratados e criopreservados foram aclimatizadas e após 30 dias observou-se que 100% de sobrevivência. Plantas de *V. quercifolia* desenvolvem um bom sistema radicular. Este deve ser um dos

principais fatores que contribuíram para esse resultado, uma vez que a formação de raízes é o passo fundamental para o sucesso de aclimatização.

Na Figura 6 é possível observar a aparência das plantas provenientes da criopreservação de embrião após 30 dias de aclimatização (100% das plântulas aclimatizadas sobreviveram). Conforme pode-se observar, todas as plantas apresentaram folhas expandidas e desenvolvimento radicular.



**Figura 7** Aspecto de planta oriunda de embrião criopreservado de *Vasconcellea quercifolia* após 30 dias de aclimatização. Barra = 1,0 cm

Todas as plantas oriundas do experimento de criopreservação apresentaram como principal característica, uma boa adaptabilidade, saindo da sala de crescimento (*in vitro*) e continuando seu desenvolvimento em sala de aclimatização (meio *ex vitro*) (Tabela 1).

Esta característica de *V. quercifolia* é importante, pois esta última etapa da micropropagação é muito delicada e crucial, tendo em vista que plantas provenientes do cultivo *in vitro* possuem características como baixa taxa fotossintética, estômatos não funcionais e folhas delgadas, as quais dificultam este processo de aclimatização, sendo um estresse pós-transplântio (COUTO; WAGNER JÚNIOR; QUEZADA, 2003).

#### **4 CONCLUSÃO**

O tempo de desidratação do embrião afeta o desenvolvimento das plantas.

Os períodos de desidratação acima de 180 minutos mostraram uma redução em todos os parâmetros avaliados.

Embriões desidratados por 30 minutos apresentaram maiores taxas de sobrevivência após a criopreservação.

Todos os sobreviventes da criopreservação aclimatizaram com sucesso.

## REFERÊNCIAS

ANDREU, P.; MARIN, J. A. *In vitro* culture establishment and multiplication of the Prunus rootstock 'Adesoto 101' (*P. insititia* L.) as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 106 p. 258-267, 2005.

BLACK, M.; OBENDORF, R. L.; PRITCHARD, H. W. Damage and tolerance in retrospect and prospect. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Ed.). **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford: CABI, 2002. p. 367-382.

COUTO, M.; WAGNER JÚNIOR, A.; QUEZADA, A. C. Efeitos de diferentes substrates durante a aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto mirabolano 29C (*Prunus cesariifera* EHRH.) em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 2, p. 125-128, 2003.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In vitro Cell & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 40, n. 5, p. 427-433, 2004.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 47, n. 1, p. 5-16, 2011.

GALINDO-ESTRELLA, T. et al. Proteolytic activity in enzymatic extracts from Carica papaya L. cv. Maradol harvest byproducts. **Process Biochemistry**, London, n. 44, v. 1 p. 77-82, 2009.

GONZÁLEZ-BENITO, J.; GONZÁLEZ-BENITO, O. Environmental proactivity and business performance: an empirical analysis. **Omega International Journal of Management Science**, Philadelphia, n. 33, v. 1, p. 1-15, 2005.

GONZALEZ-BENITO, M. E.; MARTIN, C.; VIDAL, J. R. Cryopreservation of embryogenic cell suspensions of the Spanish grapevine cultivars Albariño and Tempranillo. **Vitis**, Siebeldingen, n. 48 p. 131-136, 2009.

KINUPP, V. F.; LORENZI H., **Plantas alimentícias não convencionais (panc) no Brasil**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2014. p. 768.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and applications. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 247, n. 3, p. c125-c142, 1984.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Arevised médium for rapid growth and biomassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15,n. 3,p. 473-479, 1962.

N'NAN, O. et al. A simple protocol for cryopreservation of zygotic embryos of ten accessions of coconut (*Cocos nucifera* L.). **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Clenson, v. 48, p. 160-166, 2012.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants: crops and forest trees. **The Role of Biotechnology**, Turin, v. 5, n. 7, p. 43-54, 2005.

PANIS, B.; SWENNEN, B. P. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. **Plant Science**, Limerick, v. 168, p. 45-55, 2005.

SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS-Based vitrification and encapsulation- vitrification protocols. In: REED, B. M. **Plant Cryopreservation: a pratical guide**. Corvalis: Springer, 2008. p. 33-58.

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

SILVA, L. C. et al. Cryopreservation of *Byrsonima intermedia* embryos followed by room temperature thawing. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 36, n. 3, p. 309-315, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Viçosa, MG: UFV, 2009. 220 p.

TORRES, M. J. et al. Characterization of the proteolytic system present in *Vasconcellea quercifolia* látex, **Planta**, Berlin, v. 236 p. 1471–1484, 2012.

WEN, B.; WANG, R. Pretreatment incubation for culture and cryopreservation of *Sabal* embryos. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 102, p. 237–243, 2010.

## **CAPÍTULO 4**

**Uso da técnica de desidratação em sílica gel na criopreservação de embriões zigóticos de *Vasconcellea quercifolia* A. St. Hill (Caricaceae)**

**Revista Acta Horticulture**

## RESUMO

*Vasconcellea quercifolia* é uma espécie nativa, pertencente à família Caricaceae, que apresenta resistência ao Vírus da Mancha Anelar (PRSV) do mamoeiro e pode ser utilizada em programas de melhoramento vegetal de espécies do gênero *Papaya*, além disso, a espécie produz grande quantidade de papaína. Objetivou-se verificar a influência da desidratação de embriões durante a germinação *in vitro* e criopreservação de *V. quercifolia*. Para estudar a germinação, os embriões foram excisados e posteriormente desidratados em sílica em diferentes períodos (0, 20, 40, 80 e 100 minutos), em seguida inoculados em meio MS, suplementado com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com 7g L<sup>-1</sup> de ágar e com pH ajustado para 5,8 antes da esterilização. Para estudar a criopreservação, os embriões foram excisados e posteriormente desidratados em sílica em diferentes períodos (0, 20, 40 e 60 minutos), em seguida imersos em NL, reaquecidos em *Recovery Solution* e inoculados em meio MS. Após 30 dias de cultivo em sala de crescimento com 16h de fotoperíodo, temperatura de 25±2°C e densidade de fluxo luminoso de 36 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, para germinação foi avaliado porcentagem de embriões germinados e regenerados comprimento da parte aérea, número de folhas, número de raízes formadas e o comprimento da raiz principal, após a aclimatização foram avaliados: sobrevivência, comprimento de parte aérea, massa fresca e seca, número de raiz e comprimento da maior raiz. Para criopreservação, foi avaliado número de embriões germinados e plantas regeneradas. O tempo de desidratação do embrião afeta o desenvolvimento das plantas. Os períodos de desidratação acima de 20 minutos mostraram uma redução em todos os parâmetros avaliados. Somente os embriões desidratados por 20 minutos apresentaram germinação após a criopreservação.

Palavras-chaves: Mamãozinho-do-mato. Conservação *in vitro*. Aclimatização.

## 1 INTRODUÇÃO

O mamãozinho-do-mato (*Vasconcellea quercifolia* A. St.-Hil.) é uma espécie nativa, pertencente à família Caricaceae. Esta espécie apresenta resistência ao Vírus da Mancha Anelar (PRSV), podendo ser utilizada em programas de melhoramento vegetal de espécies do gênero *Papaya*, além disso, a espécie produz grande quantidade de papaína.

A papaína, proveniente do látex do mamoeiro, é de grande importância econômica, pois além de ser usada como desbridante, esta proteína possui ação anti-inflamatória, podendo ser utilizada em diversas fases de cicatrização, com diferentes concentrações de acordo com o tipo de tecido da ferida. A papaína também reduz o pH da ferida, estimulando a produção de citocinas que promovem a reprodução celular e tornam o meio desfavorável ao crescimento de microrganismos patogênicos (FALANGA, 2002).

Tendo em vista as características de interesse econômico de *Vasconcellea quercifolia*, o cultivo *in vitro* é uma eficiente técnica utilizada para produção de grande quantidade de material vegetal livre de contaminantes, em um curto espaço de tempo e pode ser utilizado para a multiplicação de espécies nativas com dificuldades de propagação e importância econômica (TORRES; CALDAS; BUZIOS, 1998).

Além do cultivo *in vitro*, a conservação de material biológico em temperatura ultrabaixa (-196°C) em nitrogênio líquido, conhecida como criopreservação, é uma alternativa que permite o armazenamento em longo prazo mantendo todas as características dos explantes indefinidamente. A criopreservação é uma técnica promissora para a preservação da diversidade de plantas (REED, 2008).

A maioria dos materiais utilizados na criopreservação (suspensões de células, calos, meristemas, embriões), contém quantidades elevadas de água intracelular e são, portanto, extremamente sensíveis a lesões de congelamento

causadas pela formação de cristais de gelo quando expostos a baixas temperaturas (REED, 2008). As células devem, então, ser desidratadas artificialmente para que fiquem protegidas dos danos causados pela cristalização da água. As técnicas empregadas são classificadas de acordo com os mecanismos físicos sobre os quais se baseiam e são diferenciadas em metodologia clássica e metodologias contemporâneas (ENGELMANN, 2011).

Para a aplicação bem sucedida da criopreservação é necessário que o material vegetal sobreviva à desidratação, e, na sequência, após a criopreservação, é essencial haver alta taxa de sobrevivência, manutenção de características bioquímicas, fisiológicas e estabilidade genética (FONSECA; FREIRE, 2003). Objetivou-se verificar neste estudo a influência da desidratação em sílica gel, na germinação *in vitro* e criopreservação de embriões zigóticos *V. quercifolia*.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material vegetal**

Frutos maduros de *V. quercifolia* foram coletados no município de Lavras, no sul de Minas Gerais, Brasil (21° 14 'S e 45° 00' W Gr. e 918 m de altitude). Os frutos foram colhidos, lavados e levados para a câmara de fluxo laminar, onde foram imersos em álcool 70% v / v durante um minuto, em seguida foram colocados em uma solução de hipoclorito de sódio com 1% de cloro ativo por 10 minutos e então, lavados três vezes em água estéril. Após a assepsia os frutos foram despulpados e as sementes foram imersas em álcool 70% v / v por 30 segundos e posteriormente, imersas em uma solução de hipoclorito de sódio com 1% de cloro ativo por cinco minutos. Após a desinfestação, os embriões foram excisados.

### **2.2 Teor de água**

Para determinação do teor de umidade inicial dos embriões zigóticos foi verificado o peso fresco inicial de dez embriões. Em seguida foi realizada a desidratação em sílica gel nos períodos de 0, 20, 40, 60, 80 e 100 minutos a 25 °C, a partir de então, os embriões foram completamente secos em estufa a 70 °C durante 72 horas. Os teores de água foram expressos em porcentagem.

### **2.3 Germinação**

Os embriões zigóticos excisados e desidratados em sílica gel por diferentes tempos (0, 20, 40, 60, 80 e 100 minutos) foram inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 7g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 e em seguida realizou-se a autoclavagem a 121 °C durante 20 minutos. O material foi

mantido em câmara com ausência de luz durante sete dias consecutivos, após esse período foram transferidos para sala de crescimento a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo luminoso de  $48 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  por 30 dias. Para cada tratamento foram utilizadas três repetições com dez embriões por placa de Petri. Após 30 dias avaliou-se: (i) germinação (%), germinação (embriões que desenvolveram parte aérea e radicular), (ii) número de folhas verdes, (iii) o comprimento da planta (cm), (iv) o número de raízes (v) e comprimento da maior raiz (cm).

### **2.3.1 Aclimatização**

Plantas oriundas do processo de germinação (dez plantas de cada tratamento) foram transferidas para tubetes com substrato comercial Plantmax<sup>®</sup> com cobertura de saco plástico transparente. As plantas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura média de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Nas duas primeiras semanas foram realizados cortes laterais do saco plástico, e na terceira semana toda a parte superior foi retirada. Após 30 dias foram avaliados, sobrevivência, o número de folhas e raízes, comprimento das plantas (cm), comprimento da raiz principal (cm) e o peso fresco e seco (mg).

### **2.4 Criopreservação**

Embriões zigóticos (30 por tratamento) foram extraídos de frutos maduros e desidratados nos períodos de 0, 20, 40 e 60 minutos, conforme descrito no tópico 2.1.3. Os embriões foram colocados em criotubos de 2 mL com uma gota de PVS2 (*Plant Vitrification Solution*), solução composta por 30% de glicerol (p/v), 15% de etileno glicol (p/v) e 15 % de DMSO (p/v). Em seguida, os embriões foram imersos em Nitrogênio Líquido (NL) por 30 minutos. Os materiais foram reaquecidos em *Recovery Solution* (solução de 0,4

mol L<sup>-1</sup> de sacarose em meio MS) por 45 minutos em temperatura ambiente. Após o reaquecimento, os embriões criopreservados foram inoculados em meio MS suplementado com sacarose (0,3 mol L<sup>-1</sup>) durante 24 h e mantido em câmara com ausência de luz, em seguida foram transferidos para o meio MS suplementado com sacarose (0,09 mol L<sup>-1</sup>) e mantidos na ausência de luz por seis dias. Após este período, os embriões foram transferidos para a luz em fotoperíodo de 16 h, a 25 ± 2 ° C e densidade de fluxo luminoso de 48 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> por 30 dias. Os parâmetros avaliados foram porcentagem de embriões germinados e plantas regeneradas (desenvolveram parte aérea e radicular).

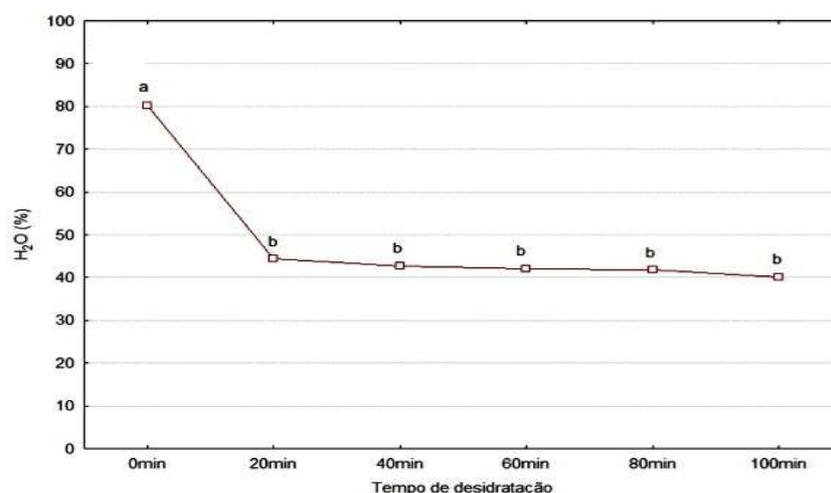
## **2.5 Análise estatística**

O delineamento foi inteiramente casualizado e os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de significância, utilizando o software estatístico (Statsoft).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Germinação

Os embriões zigóticos proveniente de frutos maduros apresentaram um teor inicial de água de 80% e a partir de 20 minutos de desidratação não houve queda significativa no teor de água permanecendo 40% (Figura 1).



**Figura 1** Teor de água de embriões de *V. quercifolia* após a desidratação por diferentes períodos (minutos) em sílica gel

A partir dos resultados obtidos verifica-se que com o aumento do período de desidratação há um decréscimo na germinação e regeneração dos embriões (Tabela 1). Possivelmente, a baixa sobrevivência dos embriões ocorre devido ao estresse causado pela desidratação, pois a morte das células reflete ao comprometimento da fisiologia, bioquímica e da estabilidade genética dos embriões (URBANOVA; KOŠUTH; ČELLÁROVÁ, 2006).

Desta forma, sabendo que a desidratação é uma etapa necessária para processos futuros de criopreservação, verificou-se neste experimento que possivelmente esta técnica poderia não ser bem sucedida em períodos maiores que 20 minutos de desidratação, pois abaixo deste período, obteve-se menos de

50% de germinação e regeneração (Tabela 1). Os embriões expostos aos maiores períodos em sílica gel (acima de 20 minutos) apresentaram queda na porcentagem de germinação e regeneração de plantas. Este decréscimo nestes parâmetros avaliados pode ter ocorrido devido à perda de água ter sido drástica (de 80 para 40% em 20 minutos).

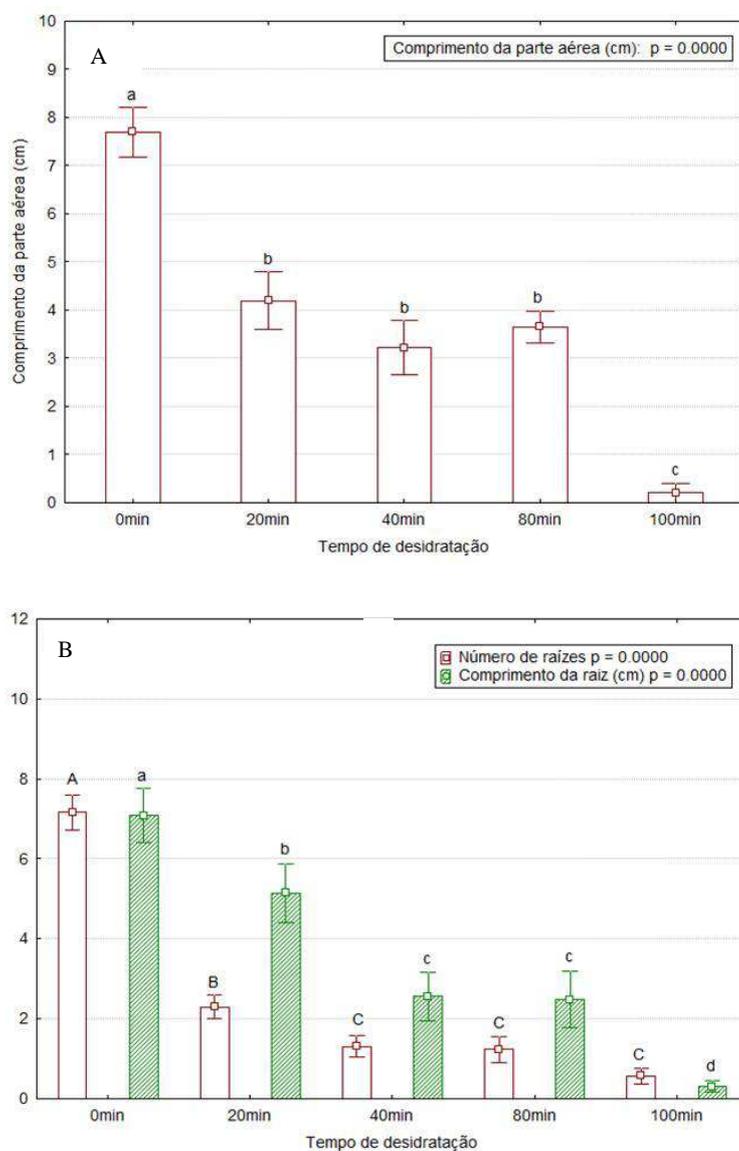
**Tabela 1** Porcentagem de embriões zigóticos que germinaram e plantas regeneradas após diferentes períodos de desidratação em sílica gel

Tempo de desidratação (min)	Germinação (%)	Regeneração (%)
0	100 a	100 a
20	83 b	76 b
40	46 c	46 c
80	43 c	37 d
100	23 d	23 e

Após 30 dias de cultivo *in vitro* dos embriões zigóticos, foi observado que os diferentes tempos de desidratação em sílica gel afetaram o crescimento das plântulas de *V. quercifolia* (Figura 2). Observou-se também que o número de folhas foi afetado pelo aumento do tempo de desidratação (Figura 2). Os períodos acima de 20 minutos causaram a diminuição do número de raízes (Figura 3D).



**Figura 2** Comparação da germinação de embriões de *Vasconcellea quercifolia* desidratados em diferentes períodos em sílica gel após 30 dias (D). Barra = 0,5 cm



**Figura 3** Comprimento da parte aérea (A), número de raízes e comprimento da raiz (B) de plantas de *V. quercifolia* após 30 dias de germinação provenientes de embriões desidratados por períodos em sílica gel

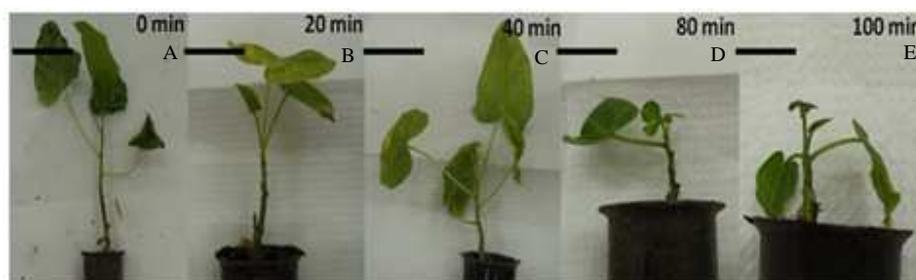
Conforme pôde ser observado na figura 2, as plantas provenientes de embriões zigóticos expostos por 20 minutos em sílica gel, apresentaram folhas

maiores em comparação com os demais tratamentos, observando-se que os parâmetros avaliados foram diminuindo à medida que aumentava o tempo de desidratação. Em relação ao número médio de raízes formadas, o tempo de até 20 minutos de desidratação apresentaram melhor formação destas (Figura 2C).

Resultados semelhantes foram obtidos em um trabalho com plúmulas de *Quercus robur* no qual se observou o efeito de desidratação em sílica gel, verificando que plúmulas que foram desidratadas durante 50 minutos tinham uma redução na taxa de sobrevivência passando a ser 18% e cerca de 0%, após secagem durante 70 minutos (CHMIELARZ et al., 2011). A diminuição da taxa de sobrevivência também foi relatada por Scocchi et al. (2007) que obtiveram apenas 27% de sobrevivência de embriões somáticos de *Melia azedarach* L., os quais permaneceram durante quatro horas em sílica gel.

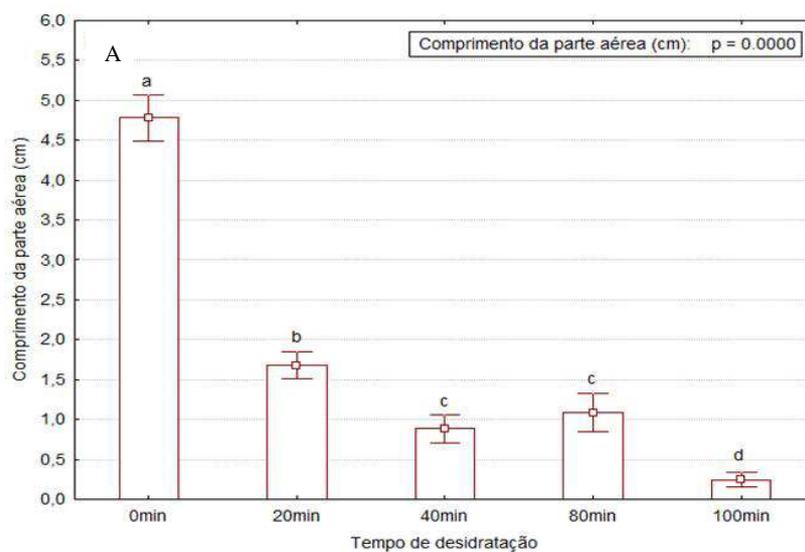
### 3.2 Aclimatização

Todas as plantas aclimatizadas sobreviveram, entretanto as plantas oriundas de embriões não desidratados apresentaram melhor crescimento durante a aclimatização. De modo geral, os tratamentos com 20 e 40 minutos de desidratação apresentaram os melhores resultados para todas as variáveis analisadas (Figura 4).

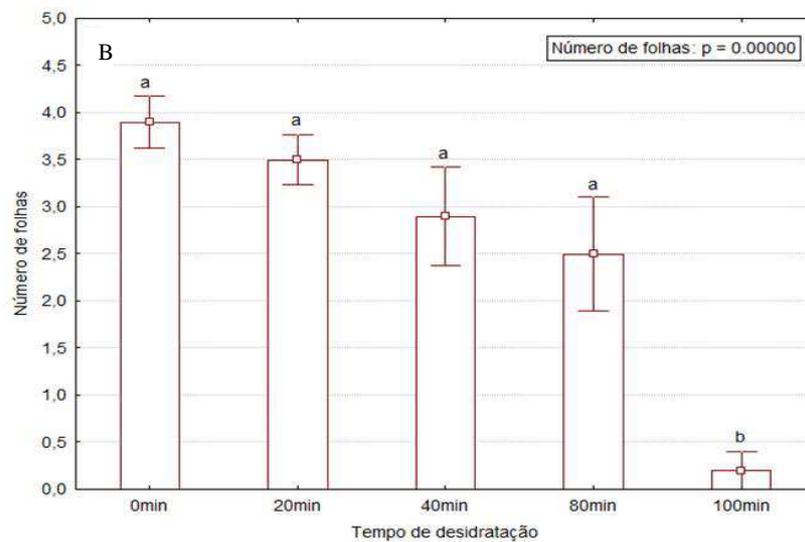


**Figura 4** Plantas de *V. quercifolia* após 30 dias de aclimatização provenientes de embriões desidratados por diferentes períodos em sílica gel. Barra = 3,0 cm (A), 2,0 cm (B), 2,5 cm (C), 1,5 cm (D) e 1,0 cm (E)

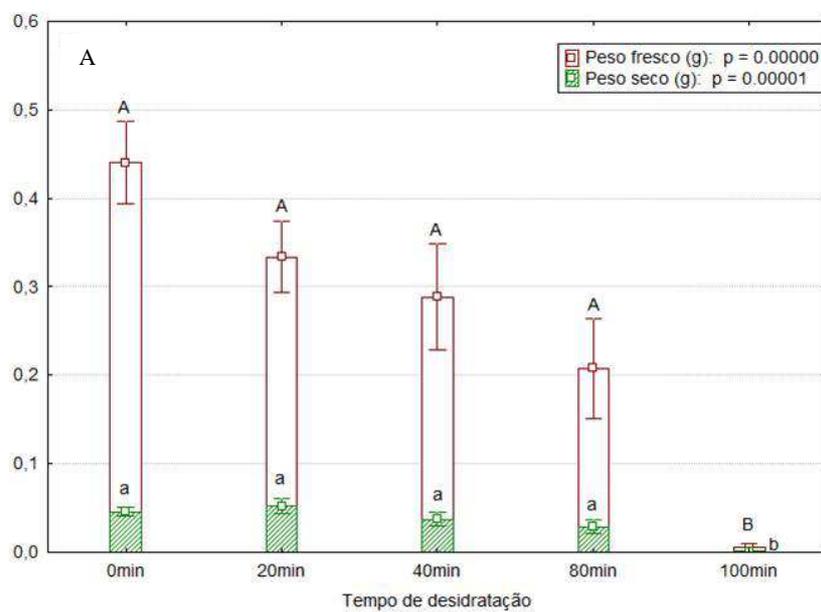
Em relação ao comprimento da parte aérea, as plantas oriundas de embriões que não foram desidratados apresentaram melhor resultado, 7,8 cm (Figura 5A), conforme pode ser observado na figura 4. Quanto ao número de folhas, não houve diferença significativa entre os tratamentos com 0, 20, 40 e 80 minutos de desidratação, apresentando médias entre 3,8 e 2,5 folhas por planta (Figura 5B). Sobre a variável peso fresco e seco (Figura 6A), as plantas provenientes dos períodos de desidratação de 20 e 40 minutos apresentaram maiores médias de peso fresco (0,34 e 0,28g respectivamente) e peso seco (0,05 e 0,03g, respectivamente). Em relação ao número e comprimento de raízes os tempos e 30, 60, 120 minutos foram os melhores tratamentos como pode ser observado na figura 6B.



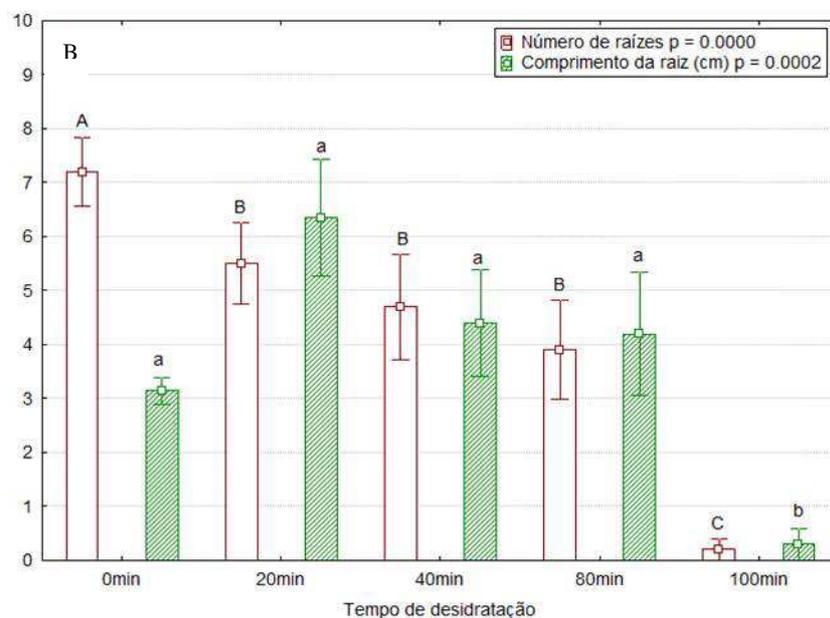
Continuação...



**Figura 5** Plantas de *V. quercifolia* após 30 dias de aclimatização provenientes de embriões desidratados por diferentes períodos em sílica gel. Comprimento da parte aérea (A) e número de folhas (B)



Continuação...



**Figura 6** Plantas de *V. quercifolia* após 30 dias de aclimatização provenientes de embriões desidratados por diferentes períodos em sílica gel. Peso fresco e peso seco (A), número de raízes e comprimento de raiz (B)

### 3.3 Criopreservação

A partir dos resultados obtidos, a desidratação em sílica gel por 20 minutos reduziu a umidade dos embriões a cerca de 50% (Figura 1), comprometendo a criopreservação destes explantes. A maior taxa de germinação foi observada no tratamento o qual os embriões foram criopreservados após a desidratação por 20 minutos em sílica gel resultando na taxa de germinação de 26% (Tabela 2), seguido pelo tratamento com 40 minutos de desidratação que apresentou 16%.

**Tabela 2** Porcentagem de embriões zigóticos de *Vasconcellea quercifolia* germinados e regenerados após criopreservação utilizando diferentes períodos de desidratação em sílica gel

<b>Tempo de desidratação (min)</b>	<b>Germinação (%)</b>	<b>Regeneração (%)</b>
0	0,0 d	0,0
20	26,0 a	6,7
40	16,0 b	0,0
60	6,7 c	0,0

Entretanto, quanto à regeneração, somente o tratamento com 20 minutos de desidratação apresentou plantas regeneradas (6,7%) após a criopreservação dos embriões. Possivelmente, esta baixa taxa de regeneração ocorreu devido à complexidade e sensibilidade dos tecidos que compõem o embrião, pois de acordo com Engelmann (2011) esses são os fatores que limitam a germinação e regeneração dos embriões zigóticos de espécies sensíveis à desidratação e esfriamento em nitrogênio líquido. Como exemplo, estas alterações ocorrem em diversas organelas como mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de golgi, comprometendo o metabolismo do embrião (SERSHEN et al., 2012).

Além disso, os embriões contêm quantidades elevadas de água intracelular e são, portanto, extremamente sensíveis a lesões de congelamento causadas pela formação de cristais de gelo quando expostos a baixas temperaturas (REED, 2008). A exposição a essas baixas temperaturas também é altamente estressante para estes explantes, podendo causar alterações metabólicas, necessitando condições favoráveis durante o pós-cultivo.

Desta forma, verifica-se que a desidratação tem que ser suficiente para não ocorrer a formação de cristais de gelo no momento do contato do material vegetal com temperaturas ultrabaixas, mas também deve haver o mínimo de água para que ocorra a formação de plantas normais durante a retomada de crescimento, entretanto, devido ao declínio nos parâmetros avaliados, sugere-se outros estudos a fim de otimizar o tempo de desidratação e as condições de pós-cultivo de embriões de *V. quercifolia*.

#### **4 CONCLUSÃO**

O tempo de desidratação do embrião afeta o desenvolvimento das plantas.

Os períodos de desidratação acima de 20 minutos causaram uma redução em todos os parâmetros avaliados.

Somente os embriões desidratados por 20 minutos apresentaram regeneração após a criopreservação.

## REFERÊNCIAS

CHMIELARZ, P. et al. Successful cryopreservation of *Quercus robur* plumules. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 30 p. 1405-1414, 2011.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 47, n. 1, p. 5-16, Nov. 2011.

FALANGA, V. Wound bed preparation and the role of enzymes: a case for multiple actions of therapeutic agents. **Wound**, Hanover, v. 1, n. 4, p. 47-57, 2002.

FONSECA, S. C. L.; FREIRE, H. B. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. **Bragantia**, Campinas, v. 62, p. 297-303, 2003.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Arevised médium for rapid growth and biomass with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-479, 1962.

REED, B. M. **Plant cryopreservation: a practical guide**. Corvallis: Springer, 2008. p. 58.

SCOCCHI, A. et al. Cryopreservation of somatic embryos of paradise tree (*Melia azedarach* L.). **Cryo Letters**, Cambridge, n. 4, p. 281-90, 2007.

SERSHEN, B. et al. Rate of dehydration, state of subcellular organization and nature of cryoprotection are critical factors contributing to the variable success of cryopreservation: studies on recalcitrant zygotic embryos of *Haemanthus montanus*. **Protoplasma**, Wien, v. 249, n. 1, p. 171-186, Jan. 2012.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. v. 1, p. 260.

URBANOVÁ, M.; KOŠUTH, J.; ČELLÁROVÁ, E. Genetic and biochemical analysis of *Hypericum perforatum* L. plants regenerated after cryopreservation. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 2, p. 140-147, Mar. 2006.