



JUDITH GEORGETTE ALCALDE MOSQUEIRA

**GERMINAÇÃO *in vitro*, CRIOPRESERVAÇÃO E CONTROLE
DE BACTÉRIAS ENDÓGENAS DE CASAQUEIRA
[*Campomanesia rufa* (O. BERG) NIED.]**

**Lavras-MG
2020**

JUDITH GEORGETTE ALCALDE MOSQUEIRA

**GERMINAÇÃO *in vitro*, CRIOPRESERVAÇÃO E CONTROLE DE BACTÉRIAS
ENDÓGENAS DE CASAQUEIRA [*Campomanesia rufa* (O. BERG) NIED.]**

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 Aplicada, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Renato Paiva, Ph.D.

Orientador

Profa. Dra. Michele Valquíria dos Reis

Coorientadora

Lavras-MG

2020

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

Mosqueira, Judith Georgette Alcalde.

Germinação *in vitro*, criopreservação e controle de bactérias endógenas de casaqueira [*Campomanesia rufa* (O.Berg) Nied.] / Judith Georgette Alcalde Mosqueira. - 2020.

90 p. : il.

Orientador(a): Renato Paiva.

Coorientador(a): Michele Valquíria Dos Reis.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Germinação. 2. Criopreservação. 3. Identificação molecular.

I. Paiva, Renato. II. Dos Reis, Michele Valquíria. III. Título.

JUDITH GEORGETTE ALCALDE MOSQUEIRA

**GERMINAÇÃO *in vitro*, CRIOPRESERVAÇÃO E CONTROLE DE BACTÉRIAS
ENDÓGENAS DE CASAQUEIRA [*Campomanesia rufa* (O. BERG) NIED.]**
In vitro **GERMINATION, CRYOPRESERVATION AND CONTROL OF
ENDOGENOUS BACTERIA OF CASAQUEIRA [*Campomanesia rufa* (O. BERG)
NIED.]**

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 Aplicada, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 30 de março de 2020

Profa. Dra. Michele Valquíria dos Reis

Dra. Débora de Oliveira Prudente

Dra. Eliana Borges Rivas

Dr. Bruno Trevenzoli Favero

UFLA

Centro de Tecnologia Canavieira

Instituto Biológico

UNESP/UCPH

Prof. Renato Paiva, Ph.D.

Orientador

Profa. Dra. Michele Valquíria dos Reis

Coorientadora

**Lavras-MG
2020**

A Deus pela força interna que faz meus dias leves e cheios de aprendizagem.

Ao meu amado Peru, porque apesar das dificuldades, amar-te e volver-me-ei a ti sempre.

A toda minha família Peruana pelo imenso amor e alegria inesgotáveis que recebo.

Aos meus pais, María Barbarita e Gonzalo, por seu amor e confiança incondicionais.

Às minhas irmãs, María e Gretell, pelo exemplo de superação e cuidados sempre.

Às minhas sobrinhas amadas, Nicole e Camila, por serem a minha inspiração colorida.

OFEREÇO

Aos meus amados anjinhos

*Camilito Jesús, papá José Alamiro e papá Chalito,
que me deixaram grandes lições de vida e sobretudo muito amor.*

In memoriam

DEDICO

Agradecimentos

À Organização dos Estados Americanos (OEA/EUA) e ao Grupo Coimbra das Universidades Brasileiras (GCUB) por conceder-me a bolsa doutoral e pela oportunidade de estudar no Brasil, entre milhões de pessoas de todo o mundo.

A CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio nos eventos acadêmicos e concessão da bolsa.

Ao pessoal da UFLA, especialmente à Diretoria de Relações Internacionais que sempre esteve solícita ao que eu precisava nos processos e documentação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Fisiologia Vegetal da UFLA em especial ao Dr. João Paulo Rodrigues Alves Delfino e meus professores pelos ensinamentos e disposição nos laboratórios.

Ao professor Renato Paiva, meu agradecimento por me abrir as portas do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (LCTP), pela exigência profissional, pelos conselhos e pelas oportunidades acadêmicas inesquecíveis que ficarão na minha vida para sempre.

À Dra. Eliana B. Rivas e ao Dr. Ricardo Harakama pela dedicação, profissionalismo e apoio incondicional na elaboração de parte da tese no Instituto Biológico em São Paulo.

Ao pessoal do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutura da Universidade Federal de Lavras pelo fornecimento dos equipamentos e suporte técnico.

A todos os meus queridos (as) amigos (as) do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (LCTP) e do Núcleo de Estudos de Paisagismo e Floricultura (NEPAFLOR), em especial à Dra. Michele Valquíria dos Reis e ao Dr. Diogo Pedrosa pelo convívio, amizade e apoio incondicional.

À Bióloga Maria Aparecida Gomes Souza-Dias, técnica do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola na UFLA, por me brindar sua amizade, ajuda incondicional e sua colaboração nos experimentos.

À minha amiga Jéssica Teodoro por me compreender tão bem que, apesar de sermos de países diferentes, combinamos sempre em tantas ideias e sonhos no meu andar pelo doutorado.

Ao Lucas B. de Souza, *mi corazón*, a quem admiro por sua dedicação, ética e disciplina profissional em tudo o que se propõe e consegue. Pelas suas ações, que dizem mais que mil palavras.

*E uma vez descoberto o vôo,
estarás condenado a caminhar olhando para o céu,
pois terás descoberto porque os pássaras cantam*

Leonardo Da Vinci

RESUMO GERAL

A *Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied. é uma espécie nativa de cerrado que apresenta grande potencial alimentício e farmacológico. No entanto, encontra-se na categoria “em perigo” de extinção pela União Internacional para a Conservação da Natureza. Soma-se ao cenário a devastação antrópica, a falta de informações técnico-científicas, germinação lenta, baixa e desuniforme, protocolos de desinfestação pouco eficientes, sensibilidade à desidratação entre outros. Por esse motivo, protocolos de micropropagação *in vitro* e desinfestação são essenciais para a realização de conservação em longo prazo, como a criopreservação. Dessa forma, objetivou-se desenvolver protocolos para o cultivo *in vitro* e criopreservação, assim como a identificação molecular de bactérias endofíticas de brotos *in vitro* de *C. rufa*. Para os protocolos de germinação, testou-se meio de cultura Murashige e Skoog (MS) a 100, 50 e 25% da concentração de sais em sementes com corte e sem corte distal. Além disso, testou-se diferentes concentrações de sacarose (0, 15, 30 ou 45 g L⁻¹) e nanotubos de carbono (0, 20, 40, 80 e 160 mg L⁻¹) no meio de cultura MS. Visando a conservação da espécie, realizou-se a criopreservação em dois tipos de explantes: sementes, mediante a desidratação e ápices caulinares mediante a *droplet vitrification*. Sementes criopreservadas e não criopreservadas foram submetidas a análises bioquímicas enzimáticas e não enzimáticas, assim como análises ultraestruturais. A germinação com corte distal foi maior (86,67±6,26%) no meio de cultura MS 100%. A sobrevivência à criopreservação de sementes (10±3,94%) com 240 min de desidratação foi superior à criopreservação de ápices caulinares (0%), no entanto, os protocolos ainda podem ser otimizados. Relata-se ainda a ocorrência da bactéria endofítica *Bacillus* sp. e da presença de diferentes ‘*strains*’ coexistindo na planta. Em condições *in vitro*, ficou evidente que a ampicilina a 32 mg L⁻¹ causou uma redução significativa da contaminação bacteriana sem, no entanto, afetar a sobrevivência dos explantes, além de promover o crescimento da planta. Por sua vez, a estreptomicina ocasionou uma maior redução da contaminação a 256 mg L⁻¹, porém foi letal a mais de 90% dos explantes nesta concentração. Portanto, os dados obtidos contribuem com a preservação de *C. rufa* ao evidenciar que o corte distal de sementes favorece a germinação no meio MS com 100% de sais suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0 a 40 mg L⁻¹ de nanotubos de carbono e 32 g L⁻¹ de ampicilina. Além disso, a criopreservação de sementes, sem corte distal, com 240 minutos de desidratação foi mais adequada para preservar sementes de *C. rufa*.

Palavras-chave: Corte distal. *Droplet vitrification*. Análises enzimáticas.

ABSTRACT

Campomanesia rufa (O. Berg) Nied. is a native species of cerrado that has great nutritional and pharmacological potential. However, it is in the category “in danger” of extinction by the International Union for the Conservation of Nature. Added to the scenario is the anthropic devastation, the lack of technical-scientific information, slow, low and uneven germination, inefficient disinfestation protocols, and sensitivity to dehydration, among others. For these reasons, *in vitro* micropropagation and disinfestation protocols are essential for long-term conservation, such as cryopreservation. Thus, the objective was to develop protocols for *in vitro* cultivation and cryopreservation, as well as the molecular identification of endophytic bacteria from *in vitro* shoots of *C. rufa*. For the germination protocols, Murashige and Skoog (MS) culture medium was tested at 100, 50, and 25% of the salt concentration in non-cut and distal-cut seeds. Besides, different sucrose concentrations (0, 15, 30, or 45 g L⁻¹) and carbon nanotubes (0, 20, 40, 80, and 160 mg L⁻¹) were tested in the MS culture medium. To conserve the species, cryopreservation was carried out in two explants types: seeds, through dehydration and stem apexes through droplet vitrification. Cryopreserved and non-cryopreserved seeds were subjected to enzymatic and non-enzymatic biochemical analyzes, as well as ultrastructural analyzes. Germination of distal-cut seeds was better (86.67±6.26%) in 100% MS culture medium. Survival to cryopreservation of seeds (10±3.94%) after 240 min of dehydration was superior to cryopreservation in stem apexes (0%), however, the protocols still can be optimized. It is reported also the occurrence of endophytic bacteria *Bacillus sp.* and the presence of different ‘strains’ coexisting in the plant. Under *in vitro* conditions, it was evident that ampicillin at 32 mg L⁻¹ caused a significant reduction in bacterial contamination without, however, affecting the survival of explants, in addition to promoting plant growth. In its turn, streptomycin caused a greater reduction in contamination at 256 mg L⁻¹, but it was lethal to more than 90% of explants. Therefore, the data obtained contribute to the preservation of *C. rufa* by showing that the distal cut of seeds favors germination in the MS medium 100% salts supplemented with 30 g L⁻¹ of sucrose, 0 to 40 mg L⁻¹ of carbon nanotubes and 32 g L⁻¹ ampicillin. Also, cryopreservation of seeds, without distal cutting, after 240 minutes of dehydration, was more adequate to preserve seeds of *C. rufa*.

Keywords: Distal cut. Droplet vitrification. Enzymatic analyzes.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	<i>Campomanesia rufa</i> (O. Berg) Nied.....	13
2.2	Cultivo <i>in vitro</i>	15
2.3	Criopreservação.....	16
2.4	Aspectos bioquímicos na criopreservação.....	18
2.5	Bactérias endofíticas na cultura <i>in vitro</i>	20
	REFERÊNCIAS.....	22
	CAPITULO 1: Germinação <i>in vitro</i> e criopreservação de <i>Campomanesia rufa</i> (O. Berg) Nied.	28
1	INTRODUÇÃO.....	31
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.1	Material vegetal e desinfestação.....	33
2.2	Germinação <i>in vitro</i> das sementes de <i>Campomanesia rufa</i>	33
2.2.1	Com ou sem corte distal em diferentes concentrações de sais do meio de cultura .	33
2.2.2	Diferentes concentrações de sacarose na germinação.....	34
2.2.3	Nanotubos de carbono no cultivo <i>in vitro</i> de sementes.....	34
2.2.4	Condições de cultivo e respostas analisadas.....	34
2.3	Criopreservação de sementes.....	34
2.3.1	Determinação de teor de umidade.....	34
2.3.2	Criopreservação.....	35
2.3.3	Análises bioquímicas.....	36
2.3.4	Análise ultraestrutural.....	38
2.4	<i>Droplet vitrification</i> de ápices caulinares.....	38
2.5	Análises Estatísticas.....	40
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
3.1	Germinação <i>in vitro</i> das sementes de <i>Campomanesia rufa</i>	41
3.1.1	Com ou sem corte distal em diferentes concentrações de sais do meio de cultura .	41
3.1.2	Germinação <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de sacarose.....	42
3.1.3	Nanotubos de carbono na germinação <i>in vitro</i> de sementes.....	44
3.2	Criopreservação de sementes.....	45
3.2.1	Determinação de teor de umidade.....	45
3.2.2	Criopreservação.....	46
3.2.3	Análises bioquímicas de sementes.....	48
3.2.4	Análise ultraestrutural.....	51
3.3	<i>Droplet vitrification</i> de ápices caulinares.....	53
4	CONCLUSÕES.....	56
	REFERÊNCIAS.....	57
	CAPITULO 2: Isolamento, identificação molecular e controle <i>in vitro</i> de bactérias endógenas de <i>Campomanesia rufa</i> (O. Berg) Nied.	65
1	INTRODUÇÃO.....	68
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	70
2.1	Isolamento e identificação das bactérias endógenas.....	70
2.1.1	Identificação da planta.....	70
2.1.2	Germinação e multiplicação <i>in vitro</i>	70
2.1.3	Isolamento da bactéria presente em <i>Campomanesia rufa</i>	71
2.1.4	Coloração de Gram.....	71

2.1.5	Extração de DNA genômico da bactéria	71
2.1.6	Amplificação por PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	72
2.1.7	Purificação do produto da PCR e sequenciamento	72
2.1.8	Análise das sequências e filogenia	73
2.2	Antibióticos para o controle <i>in vitro</i> de bactérias endógenas de <i>Campomanesia rufa</i> 73	
2.2.1	Uso de antibióticos em meio de cultura	73
2.2.2	Análises Estatísticas	73
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
3.1	Colônias de bactéria em meio de propagação	74
3.2	Características das colônias bacterianas	75
3.3	Análise do DNA bacteriano e PCR.....	77
3.4	Análise das sequências e filogenia	78
3.5	Antibióticos para o controle <i>in vitro</i> de bactérias endógenas em brotos de <i>Campomanesia rufa</i>	81
4	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS	86

1 INTRODUÇÃO GERAL

O bioma Cerrado ocupa 22% do território brasileiro, abrigando um vasto e diverso patrimônio genético, único no mundo (REIS; SCHMIELE, 2019). O Cerrado possui um terço da biodiversidade brasileira e 40% de espécies endêmicas vegetais (MONTEIRO et al., 2018). Além disso, nele nascem águas que abastecem seis das oito maiores bacias hidrográficas brasileiras (JESUS et al., 2017). No entanto, o bioma vem sendo devastado pela ação antrópica (PINHEIRO; MARCELINO; MOURA, 2018).

Por sua vez, a família Myrtaceae ocupa o segundo lugar por domínio fitogeográfico no Cerrado e abrange espécies com alto potencial econômico (SILVESTRE; MIRANDA; DE-CARVALHO, 2019). Myrtaceas do gênero *Campomanesia*, incluindo-se entre elas a espécie *Campomanesia rufa*, apresentam potencial alimentício, ornamental e farmacêutico (ZUNINGA et al., 2018; CARVALHO et al., 2019).

C. rufa, conhecida como casaqueira ou gabioba de árvore, é uma espécie frutífera nativa do Cerrado brasileiro que atualmente se encontra na Red List da IUCN-*International Union for Conservation of Nature* (2020) devido à constante deterioração antrópica de seu habitat. Outra espécie brasileira filogeneticamente próxima à *C. rufa*, a *C. lundiana*, já foi declarada extinta (IUCN, 2020). Além disso, considera-se uma espécie de dados escassos, apesar de ser utilizada pela população local como alimento e fitoterápico (IUCN, 2020).

Estratégias eficientes de multiplicação *in vitro* e *ex vitro* destas espécies são igualmente escassas (SANT´ANA et al., 2018). Espécies do mesmo gênero apresentam diversas limitações como a falta de informações técnico-científicas, germinação lenta, baixa e desuniforme, protocolos de desinfestação pouco eficientes, sensibilidade à desidratação entre outros (MAYRINCK; VAZ; DAVIDE, 2016; BARBEDO, 2018; SANT´ANA et al., 2018).

Neste sentido, o desenvolvimento de técnicas mais ajustadas de cultivo *in vitro* auxiliariam tanto a propagação de *C. rufa* quanto o emprego de tecnologias de conservação (ALMEIDA et al., 2016). Destaca-se como estratégia de conservação em longo prazo a criopreservação, que consiste em conservar explantes (sementes, suspensões celulares, calos embriogênicos, ápices caulinares, gemas axilares, embriões zigóticos e somáticos) a ultrabaixas temperaturas (-196 °C) (ENGELMANN, 2011; PRUDENTE; PAIVA, 2017).

Para fins de conservação de uma espécie, as sementes são explantes adequados por serem sistemas organizados (PRITCHARD et al., 2017). Da mesma forma, ápices caulinares

também têm se mostrado eficientes para a conservação de espécies, pois possuem células que não apresentam ligação vascular entre o meristema e o restante dos tecidos, proporcionando explantes livres de patógenos (NORMAH; SULONG; REED, 2019).

No entanto, o uso da criopreservação ainda carece de muitas pesquisas e ajustes de fatores considerados limitantes devido a dependência do genótipo no desenvolvimento de novos protocolos (FRAGA et al., 2016). Portanto, há a necessidade de estudos focados em espécies com potencial econômico, mas que a literatura ainda não aborda por serem subutilizadas comercialmente.

No mesmo sentido, o desenvolvimento de protocolos de desinfestação é limitante (ALI et al., 2018), ainda mais quando se trata de espécies lenhosas (SALLES et al., 2017) como a *C. rufa*. Entre os principais inconvenientes aparece a contaminação por microrganismos, principalmente por bactérias endofíticas (BACON; WHITE, 2016). Isso ocorre uma vez que diversas espécies nativas vivem em associação com bactérias endofíticas no ambiente (SAVI; ALUIZIO; GLIENKE, 2019).

Por outro lado, o uso de antibióticos visando o controle de bactérias endofíticas pode exercer ação bacteriostática, fitotóxica e causar alterações nas respostas morfogênicas (MINDEN et al., 2017). Por essa razão, o controle de bactérias endofíticas pode se tornar limitante, levando à perda de recursos financeiros, de tempo e de material genético (BACON; WHITE, 2016).

Assim, considera-se fundamental o isolamento e identificação das bactérias endofíticas visando seu controle no meio (CHEONG; NA; JEONG, 2019). Nesse sentido, o uso de metodologias moleculares permite a amplificação e sequenciamento de fragmentos do gene ribossomal 16S RNA de forma segura, útil e aceita para a identificação molecular e caracterização bacteriana. Ao mesmo tempo, viabiliza a determinação de posições filogenéticas dentro de comunidades bacterianas (RHODEN et al., 2015).

Assim, objetivou-se desenvolver um protocolo para o cultivo *in vitro* e criopreservação, assim como a identificação molecular de bactérias endofíticas de plântulas *in vitro* de *C. rufa*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied.

Campomanesia rufa pertence à família Myrtaceae, a qual engloba plantas na ordem Myrtales e clado Eudicotiledoneae, contando com 132 gêneros de espécies arbóreas ou arbustivas. Muitas dessas espécies são frutíferas e ricas em óleos essenciais apreciados em perfumes ou empregados em fármacos, derivados de plantas cultivadas para fins comerciais e ornamentais, destacando-se: murta, cravo-da-índia, goiabeira e eucalipto (DE OLIVEIRA; FUNCH; LANDRUM, 2012)

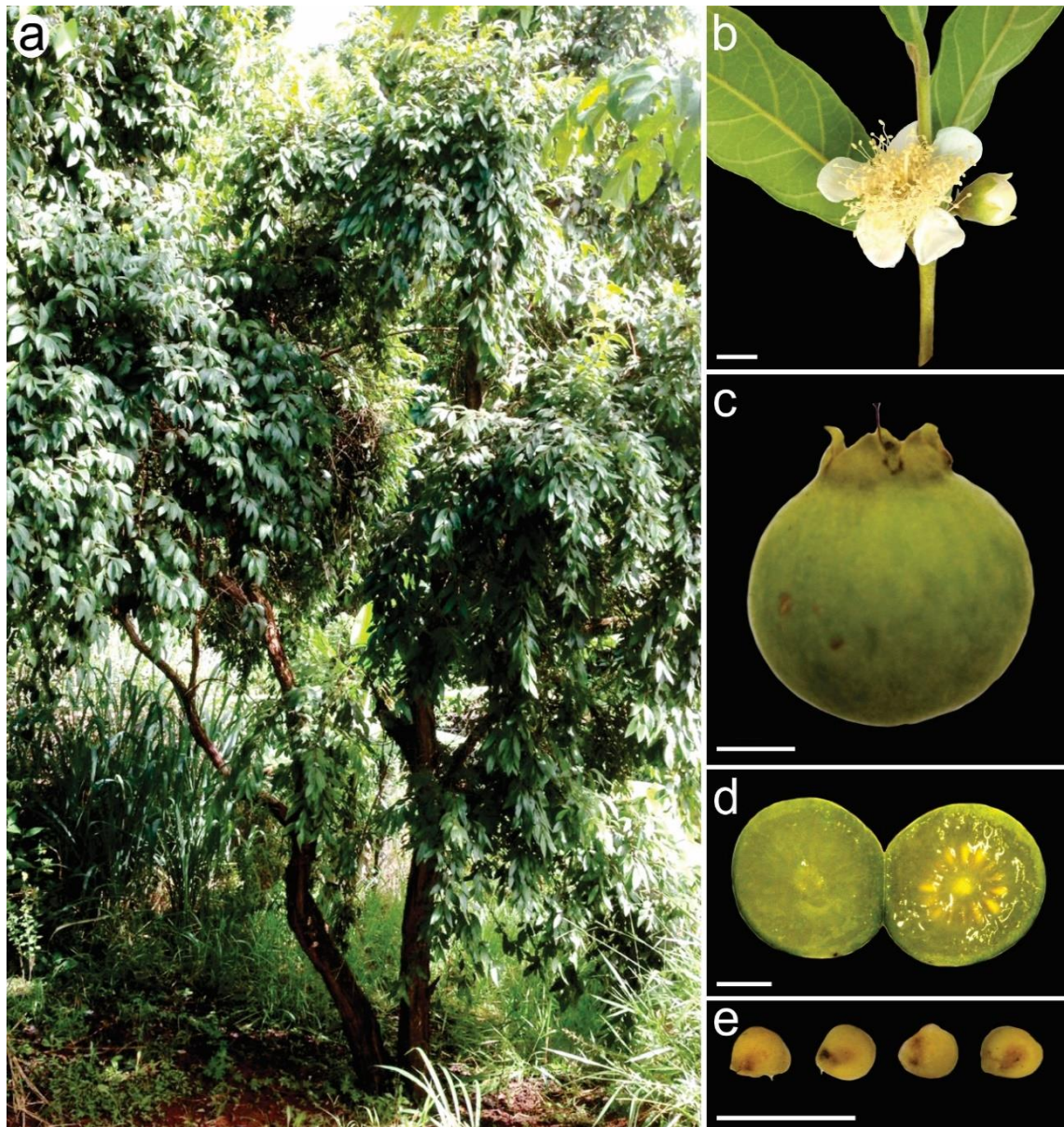
Por sua vez, *C. rufa* é uma espécie endêmica do Brasil conhecida popularmente como casaqueira, guabiroba ou guabiroba de árvore. É nativa do Brasil com distribuição geográfica no Sudeste de Minas Gerais e com domínios fitogeográficos no Cerrado e Mata Atlântica (REFLORA, 2020). Apresenta potencial nutricional, farmacêutico e ornamental (ZUNINGA et al., 2018; CARVALHO et al., 2019).

C. rufa é uma angiosperma arbórea (Figura 1a), com altura média entre 8 e 15 m, podendo chegar a até 25 m. O caule apresenta córtex espesso (LANDRUM, 1986). Possui folhas simples de filotaxia oposta com comprimento de 4-8 cm e largura de 1,5-3,6 cm. O limbo (Figura 1b) apresenta margem inteira, elíptico e pontos translúcidos, que são glândulas produtoras de óleos essenciais terpênicos (LUBER et al., 2017).

As flores (Figura 1b) são hermafroditas, pequenas e de coloração creme-esbranquiçado (LANDRUM, 1986). Frutos maduros (Figura 1c) apresentam coloração verde amarelado (LUBER et al., 2017). São comestíveis e medem entre 2-3 cm de diâmetro e apresentam entre 5-13 lóculos (Figura 1d) (LANDRUM, 1986). A propagação da espécie é mediante sementes (Figura 1e) (LANDRUM, 1986).

Os frutos de espécies do gênero *Campomanesia* apresentam alto teor de ácido cítrico, compostos fenólicos e β -caroteno, ambos com capacidade antioxidante (REIS; SCHMIELE, 2019). Adicionalmente, apresentam potencial alimentício, ornamental e farmacêutico (DA SILVA et al., 2016; SÁ et al., 2018; ZUNINGA et al., 2018; CARVALHO et al., 2019).

Figura 1 - *Campomanesia rufa*.



Legenda: (a) Árvore, (b) flor, (c) parte externa, (d) parte interna do fruto maduro e (e) sementes de *Campomanesia rufa*. Barra = 1 cm.

Fonte: Da autora (2020).

A conservação do germoplasma da espécie através das sementes é limitada porque apresenta germinação lenta, baixa, desuniforme e perda de vigor após desidratação (SANT'ANA et al., 2018). Adicionalmente, *in situ* acontece o desmatamento, comprometendo a existência de diversas espécies do Cerrado (SOUSA et al., 2017) como a *C. rufa*, a qual se encontra na *Red List* da IUCN (2020).

Contudo, apesar de ser uma espécie de ocorrência limitada classificada como vulnerável (IUCN, 2020), com grande potencial para produção, exploração de frutos e seus

derivados e das propriedades medicinais utilizadas pela comunidade local, existem poucos estudos relacionados a espécie.

2.2 Cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* abrange técnicas que exploram a totipotência das células, tecidos ou órgãos vegetais cultivados em meios de cultura (DAMIANI et al., 2016). A capacidade de desdiferenciação celular dependerá de diferentes fatores como genótipo da espécie, idade e estágio fenológico do tecido, a disponibilidade de nutrientes no meio de cultura, reguladores de crescimento e condições adequadas de luz, pH, umidade e temperatura (IKENGANYIA et al., 2017).

O cultivo *in vitro* permite a propagação massal de plantas com genótipos superiores sob condições assépticas (SILVA et al., 2018). Isso ocorre em ciclos mais curtos de tempo e independente da época do ano (SILVA et al., 2018). O cultivo *in vitro* é uma alternativa para espécies com dificuldade de germinação *in situ*, permitindo depois a reintrodução a seus habitats naturais (ALMEIDA et al., 2016).

Durante o cultivo *in vitro* a germinação de *C. rufa* atingiu 68% aos 90 dias (SANT'ANA et al., 2018) no meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar (SANT'ANA et al., 2018). Na etapa de brotação, o efeito de 4,5 µM de 6-benzilaminopurina (BAP) induziu ao maior número de brotações (4,53) (SANT'ANA et al., 2018).

O uso de 8,8 µM de ácido giberélico (GA₃) induziu ao maior comprimento (31,9 mm) na *C. rufa*. Por sua vez, a partir de segmentos foliares ocorreu a maior formação de calos (58,7%) com o uso de 10 µM de ácido 2,4-diclorofenóxi-acético (2,4-D). Não obstante, a oxidação dos explantes foi limitada a 27,3% mediante a adição de 584,3 µM de polivinilpolipirrolidona (PVP) no meio de cultura (SANT'ANA et al., 2018).

A luz de lâmpadas fluorescentes (branca) e a adição de reguladores de crescimento (BAP) no meio de cultura MS são sugeridos para o aumento do número de folhas e de brotos em *C. rufa* (SANT'ANA et al., 2018).

Porém, trabalhos realizados *in vitro* assim como *ex vitro* de *C. rufa* ainda são escassos e deveriam ser promovidos, pois o emprego de tecnologias de conservação de espécies, como

a criopreservação, muitas vezes precisam de explantes provenientes do cultivo *in vitro* (ALMEIDA et al., 2016).

2.3 Criopreservação

A criopreservação é uma técnica de conservação mediante o uso de temperaturas ultrabaixas (-196 °C) ou em sua fase de vapor (-150 °C). Nessas temperaturas, teoricamente, consegue-se diminuir ou até mesmo paralisar as reações metabólicas do material vegetal, e conseqüentemente conservá-lo por longo tempo (PANIS; LAMBARDI, 2006).

A criopreservação permite a conservação da diversidade genética, principalmente de espécies em risco de extinção com potencial econômico (PANIS; LAMBARDI, 2006). A técnica permite usar uma ampla variedade de explantes como: protoplastos, suspensões celulares, calos, ápices caulinares, gemas laterais, sementes, embriões zigóticos e somáticos (PRUDENTE et al., 2016; PENCE et al., 2017; SILVA et al., 2018)

Outras vantagens da criopreservação são: o uso reduzido de espaço, baixo risco de contaminação, simplicidade no manuseio das condições de estocagem, baixa manutenção do material criopreservado, não requer energia elétrica, baixo custo de manutenção, isenção de danos ambientais e mitigação do risco de variações genéticas e epigenéticas (BENITO et al., 2016; PENCE et al., 2017; STRECZYNSKI et al., 2019).

O sucesso da criopreservação depende da prevenção de danos letais às membranas e organelas celulares por causa de cristais de gelo (PANIS; LAMBARDI, 2006). Por essa razão, os explantes devem ser desidratados de forma controlada, pois a desidratação intensa aumenta a concentração de sais intracelulares, podendo causar a morte celular (PINTO et al., 2016).

A desidratação pode ser realizada pela exposição do explante à sílica gel, à câmara de fluxo laminar, pelo uso de substâncias crioprotetoras (dimetilsufóxido (DMSO), glicerol, etileno glicol, polietileno glicol, glicose, sacarose, manitol, trealose, prolina e floroglucinol) adicionadas ao meio de pré-cultivo, provocando desidratação osmótica do explante, ou pela combinação de técnicas (SAKAI; ENGELMANN, 2007; SALOMÃO et al., 2016).

A desidratação mediante a exposição à sílica gel tem sido preferida para uso em materiais vegetais como as sementes de diversas espécies em razão: do baixo custo, da fácil execução, e da preservação poder ser feita diretamente em nitrogênio líquido, sem o uso de

crioprotetores. Nessa perspectiva, as sementes são explantes adequados por serem sistemas organizados (SANTOS et al., 2014).

Não obstante, o tempo de exposição a substâncias crioprotetoras para desidratação é um fator importante, pois algumas podem ser tóxicas (PRUDENTE et al., 2019). Os crioprotetores devem apresentar a capacidade de penetrar nas células para promover uma maior osmolaridade, garantindo sua máxima eficiência (PANIS; LAMBARDI, 2006).

Na etapa seguinte, o congelamento rápido evita o colapso celular graças à vitrificação das células onde a água intracelular passa a um estado vítreo, que garante estabilidade química ao excluir reações químicas que requerem difusão, e impede a concentração de solutos caotrópicos (XIE et al., 2018; STRECZYNSKI et al., 2019).

Subsequentemente, o descongelamento deve se realizar mediante a imersão imediata das amostras congeladas em banho de água a 40 °C, por curto tempo, evitando-se assim a recristalização do gelo, que provoca injúrias na membrana celular (XIE et al., 2018). A seguir, a avaliação no meio pós-descongelamento permite determinar a regeneração dos explantes após imersão no nitrogênio líquido (XIE et al., 2018).

A preferência pela utilização de sementes possibilita a formação de uma planta inteira dispensando etapas mais complexas de cultivo *in vitro* como indução de brotações, multiplicação e enraizamento (BALLESTEROS et al., 2014). No entanto, a escolha do explante ideal depende da espécie e dos diferentes tecidos de uma mesma espécie (REED, 2017).

As técnicas de criopreservação utilizadas até o momento são: *dehydrated by air-drying* (desidratação ao ar), *slowing freezing* (congelamento lento), *encapsulation-dehydration* (encapsulamento-desidratação), *encapsulation-vitrification* (encapsulamento-vitrificação), *programmed freezing* (congelamento programado), *vitrification* (vitrificação), *droplet freezing* e *droplet vitrification* (SAKAI; ENGELMANN, 2007; MATSUMOTO, 2017; REED, 2017).

A *droplet vitrification* vem apresentando resultados promissores para ápices caulinares, gemas axilares e embriões somáticos. Previamente, os explantes devem passar por um tratamento apropriado de desidratação e/ou vitrificação antes do congelamento em nitrogênio (KULUS; ZALEWSKA, 2014).

Protocolos de criopreservação são modificados constantemente para testar novas substâncias e técnicas de congelamento que permitam a sobrevivência do explante vegetal (TEIXEIRA; DOBRÁNSZKI; ROSS, 2013; LONDE et al., 2017). Entre as substâncias que

estão sendo utilizadas e resultaram em alta taxa de sobrevivência dos explantes está o floroglucinol (BRUŇÁKOVÁ; ČELLÁROVÁ, 2016; LONDE et al., 2017).

O uso do floroglucinol (1,3,5-triidroxibenzeno) na criopreservação permite proteger as células contra o estresse oxidativo e danos causados pelos radicais livres (LONDE et al., 2017). Assim, o uso de floroglucinol adicionado ao *Plant Vitrification Solution 2* (PVS2) [30% glicerol (p/v), 15% etilenoglicol (p/v), 15% DMSO (p/v), 0,4 M sacarose no meio basal de cultura], mais que duplicou a sobrevivência de protocormos de *Dendrobium* (VENDRAME; FARIA, 2011). Do mesmo modo, o uso de floroglucinol aumentou para 60% a viabilidade de sementes de *Cattleya granulosa* Lindl., espécie em perigo de extinção (SUZUKI et al., 2018).

Não existem informações e nem estudos disponíveis sobre a criopreservação de *C. rufa*. Por se tratar de uma espécie que se encontra em risco de extinção, é de fundamental interesse a realização destes estudos, bem como à avaliação dos efeitos do congelamento sobre a integridade celular e potencial regenerativo.

2.4 Aspectos bioquímicos na criopreservação

O uso de soluções crioprotetoras como a *Loading Solution* (LS), (PVS) e *Recovery Solution* (RS) (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1991) permitem regular o equilíbrio entre a produção e detoxificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (CHEN et al., 2015).

No entanto, períodos longos de exposição ao PVS2 podem interferir na homeostase celular (DIETZ; MITTLER; NOCTOR, 2016; FUNNEKOTTER; MANCERA; BUNN, 2017). Para manter a homeostase, células vegetais ativam mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos para manter níveis estáveis de EROs (STRECZYNSKI et al., 2019).

Níveis altos das EROs reagem com lipídios de membranas, podendo ocorrer peroxidação lipídica e desencadear a morte celular programada dos explantes criopreservados (FUNNEKOTTER; MANCERA; BUNN, 2017). A atividade das enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e metabólitos não enzimáticos como o ascorbato (ASC) / glutationa (GSH) neutralizam os danos das EROs nas proteínas, lipídeos e DNA (STRECZYNSKI et al., 2019).

A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra as EROs, catalisando a dismutação de dois radicais O_2^- (radical superóxido), gerando H_2O_2 e O_2 (GILROY; ET AL.,

2016). As isoformas da SOD são classificadas de acordo com o seu metal cofator (NOCTOR; REICHHELD; FOYER, 2018). FeSODs e MnSODs são encontradas nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos. No entanto, as Cu/ZnSODs são encontradas nos cloroplastos, no citosol e no espaço extracelular (NOCTOR; REICHHELD; FOYER, 2018).

A catalase (CAT) e a peroxidase do ascorbato (APX) são responsáveis pela dismutação do H_2O_2 em O_2 e H_2O (CHOUDHURY et al., 2017). A CAT e suas isoformas são consideradas indispensáveis na eliminação de H_2O_2 , principalmente, em condições de estresse severo como temperaturas ultrabaixas, quando as concentrações são altas (MHAMDI; VAN BREUSEGEM, 2018). Atua nos peroxissomos e glioxissomos e também pode ser encontrada nas mitocôndrias (NOCTOR; REICHHELD; FOYER, 2018).

Diferentemente, a APX requer a presença de uma molécula redutora como o ácido ascórbico (MIGNOLET-SPRUYT et al., 2016). A distribuição das isoenzimas de APX vai desde a mitocôndria (miAPX), citosol (cAPX), peroxissomo/glioxissomo (mAPX) e cloroplastos (chlAPX), onde ocorre em duas isoformas: a forma da membrana do tilacóide (tAPX) e a forma solúvel no estroma (sAPX) (SILVA et al., 2019).

Nos cloroplastos e mitocôndrias, a APX utiliza ascorbato como doador de elétrons para reduzir H_2O_2 , formado pela SOD, fazendo parte do ciclo ascorbato-glutationa (CHOUDHURY et al., 2017). Enquanto, a tAPX e sAPX eliminam o H_2O_2 produzido pela fotossíntese (SOUSA et al., 2019). Por sua vez, o H_2O_2 produzido na respiração é eliminado pela mAPX e a miAPX. A função fisiológica da cAPX é de proteção das plantas sob várias condições de estresse, como a criopreservação (SILVA et al., 2019).

Adicionalmente, o sistema não enzimático confere ao sistema antioxidante a capacidade de poder controlar o acúmulo e eliminação das EROs (CHOUDHURY et al., 2017). É composto por proteínas em sistemas associados à membrana ou lipossolúveis e sistemas solúveis em água, evitando a perda da integridade da membrana, que é resultado da peroxidação de lipídeos (MITTLER, 2017). Apresenta-se nas membranas dos cloroplastos e vacúolos, mas pode estar presentes em outras organelas (MITTLER, 2017).

Pesquisas mostram a importância do metabolismo antioxidante para o sucesso da criopreservação em gemas axilares de *Hancornia speciosa* (PRUDENTE et al., 2017) e embriões de *Passiflora ligularis* (PRUDENTE et al., 2019). No entanto, *Hypericum tetrapterum* não apresentou estresse oxidativo significativo devido a criopreservação (GEORGIEVA et al., 2014). Apesar disso, a desidratação, o resfriamento e o

descongelamento podem induzir à produção de EROs (PRUDENTE; PAIVA, 2017). Contudo, os estudos que relacionem tais compostos durante a criopreservação de sementes na *C. rufa* são inexistentes.

Concentrações adequadas de EROs são importantes e podem estimular a transcrição de genes de defesa e desencadear respostas adaptativas na planta em condições adversas como ultra baixas temperaturas (CHOUDHURY et al., 2017).

Portanto, análises bioquímicas enzimáticas e não enzimáticas auxiliam na compreensão dos eventos envolvidos nas respostas às condições adversas às quais uma planta está suscetível, como ultrabaixas temperaturas durante a criopreservação (PRUDENTE et al., 2019). Conseqüentemente, essa compreensão permite entender e melhorar os protocolos e processos da criopreservação de uma espécie vegetal.

2.5 Bactérias endofíticas na cultura *in vitro*

As bactérias endofíticas são microrganismos que colonizam tecidos vegetais internos, sem causar danos aparentes (QUAMBUSCH; WINKELMANN, 2018). O ingresso das bactérias endofíticas pode ser através dos órgãos da planta (BACON; WHITE, 2016). As feridas também são portas de entrada para as bactérias endofíticas (LIU et al., 2017). Adicionalmente, as bactérias endofíticas podem ser transmitidas via semente ou através de propágulos vegetativos (BACON; WHITE, 2016).

As bactérias endofíticas podem gerar benefícios para a planta hospedeira, como a proteção contra patógenos, contra a seca (ELJOUNAIDI; LEE; BAE, 2016), produção de promotores de crescimento, de compostos extracelulares voláteis (TAHIR et al., 2017), aumento na eficiência fotossintética e aumento principalmente da disponibilidade de nitrogênio (N), fósforo (P) e ferro (Fe) no solo (BACON; WHITE, 2016).

No entanto, a presença de bactérias endofíticas na cultura de tecidos vegetais é prejudicial devido à perda do material genético, recursos financeiros e tempo (QUAMBUSCH; WINKELMANN, 2018). Como agravante, algumas bactérias endofíticas são detectadas depois de um longo período de tempo por estarem em estado de latência ou, em outros casos, são detectadas após a introdução do explante *in vitro* (KAŁUŻNA et al., 2014).

Por este motivo, uma alternativa de controle *in vitro* para bactérias endofíticas é o uso de antibióticos devido ao seu potencial bactericida e bacteriostático (KHAN et al., 2018; CHEONG; NA; JEONG, 2019). No entanto, o uso inadequado de antibióticos pode levar ao desenvolvimento de resistência no microrganismo e fitotoxicidade no explante vegetal (MINDEN et al., 2017).

Por essa razão, deve-se realizar um isolamento e determinação das bactérias endofíticas visando seu controle *in vitro* (KHAN et al., 2018). O uso de técnicas moleculares apresenta uma grande vantagem frente a outras técnicas por causa da sua precisão, sensibilidade e especificidade na identificação da bactéria (QUAMBUSCH; WINKELMANN, 2018).

O gene que codifica para a subunidade 16 S ribossomal (rRNA) é o mais utilizado quando o objetivo é realizar a identificação inicial de uma bactéria (KAI et al., 2019). A sequência genômica obtida é, então, comparada às sequências homólogas existentes no GenBank, usando o algoritmo BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) e alinhada com tais sequências homólogas, com o uso de programas específicos. O conjunto de sequências alinhadas é submetida a análises para reconstrução de árvores filogenéticas, que inferem relacionamento entre as espécies (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

Assim, a identificação de bactérias endofíticas permitiria estabelecer protocolos eficientes de desinfestação (ALI et al., 2018) nas espécies em perigo de extinção, como a *C. rufa* (IUCN, 2020). Do mesmo modo, existem poucos estudos sobre bactérias endofíticas isoladas em plantas nativas (SAVI; ALUIZIO; GLIENKE, 2019), sobretudo na família Myrtaceae, que é a segunda maior e de importância econômica do Cerrado brasileiro (SAVI; ALUIZIO; GLIENKE, 2019).

REFERÊNCIAS

- ALI, M. et al. Endogenous bacterial contamination of plant tissue culture materials: Identification and control strategy. **Plant Tissue Culture & Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 99–108, 2018.
- ALMEIDA, L. V. da S. et al. As plantas medicinais e a micropropagação como ferramenta para sua expansão e utilização. **Revista Textura**, v. 9, n. 16, p. 1–14, 2016.
- BACON, C. W.; WHITE, J. F. Functions, mechanisms and regulation of endophytic and epiphytic microbial communities of plants. **Symbiosis**, v. 68, n. 1–3, p. 87–98, 2016.
- BALLESTEROS, D. et al. Uneven drying of zygotic embryos and embryonic axes of recalcitrant seeds: Challenges and considerations for cryopreservation. **Cryobiology**, v. 69, n. 1, p. 100–109, 2014.
- BARBEDO, C. J. A new approach towards the so-called recalcitrant seeds. **Journal of Seed Science**, v. 40, n. 3, p. 221–236, 2018.
- BENDITO, B. P. C. et al. Espécies do cerrado com potencial para recuperação de áreas degradadas, Gurupi (TO). **Revista Agrogeoambiental**, v. 10, n. 2, p. 99–110, 2018.
- BENITO, M. E. G. et al. Effect of antioxidants on the genetic stability of cryopreserved mint shoot tips by encapsulation-dehydration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 127, n. 2, p. 359–368, 2016.
- BRUŇÁKOVÁ, K.; ČELLÁROVÁ, E. Conservation Strategies in the Genus *Hypericum* via Cryogenic Treatment. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 558, p. 1–12, 2016.
- CARVALHO, J. T. de G. de et al. Medicinal plants from Brazilian Cerrado: Antioxidant and anticancer potential and protection against chemotherapy toxicity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–16, 2019.
- CHEN, G. Q. et al. Cryopreservation affects ROS-induced oxidative stress and antioxidant response in *Arabidopsis* seedlings. **Cryobiology**, v. 70, n. 1, p. 38–47, 2015.
- CHEONG, E. J.; NA, M.; JEONG, U. The effect of endophytic bacteria on *in vitro* shoot growth of *Prunus yedoensis* and its identification and elimination. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 103, p. 1–7, 2019.
- CHOUDHURY, F. K. et al. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. **Plant Journal**, v. 90, n. 5, p. 856–867, 2017.
- DA SILVA, E. R. S. et al. Anti-inflammatory evaluation and toxicological analysis of *Campomanesia xanthocarpa* Berg. **Inflammation**, v. 39, n. 4, p. 1462–1468, 2016.

- DAMIANI, C. R. et al. Seed origin, storage conditions, and gibberellic acid on *in vitro* germination of *Campomanesia adamantium*. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 32, p. 1731–1737, 2016.
- DE OLIVEIRA, M. I.; FUNCH, L. S.; LANDRUM, L. R. Flora da Bahia: *Campomanesia* (Myrtaceae). **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 12, n. 1, p. 91–107, 2012.
- DIETZ, K. J.; MITTLER, R.; NOCTOR, G. Recent progress in understanding the role of reactive oxygen species in plant cell signaling. **Plant Physiology**, v. 171, n. 3, p. 1535–1539, 2016.
- ELJOUNAIDI, K.; LEE, S. K.; BAE, H. Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases – Review and future prospects. **Biological Control**, v. 103, n. 2016, p. 62–68, 2016.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 47, n. 1, p. 5–16, 2011.
- FRAGA, H. P. F. et al. High-efficiency cryopreservation of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze embryogenic cultures: ultrastructural characterization and morpho-physiological features. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 124, n. 2, p. 307–318, 2016.
- FUNNEKOTTER, B.; MANCERA, R. L.; BUNN, E. Advances in understanding the fundamental aspects required for successful cryopreservation of Australian flora. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 53, p. 289–298, 2017.
- GILROY, S.; ET AL. ROS, calcium and electric signals: key mediators of rapid systemic signaling in plants. **Plant Physiology**, v. 171, n. 3, p. 1606–1615, 2016.
- IKENGANYIA, E. et al. Plant Tissue Culture Regeneration and Aseptic Techniques. **Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology**, v. 1, n. 3, p. 1–6, 2017.
- IUCN – International Union for Conservation of Nature. **The IUCN red list of threatened species**. Version 2020-1. Available in: <www.iucnredlist.org>. Access in: March, 14, 2020.
- KAI, S. et al. Rapid bacterial identification by direct PCR amplification of 16S rRNA genes using the MinION TM nanopore sequencer. **FEBS Open Bio**, v. 9, n. 9, p. 548–557, 2019.
- KALUŻNA, M. et al. Detection, isolation, and preliminary characterization of bacteria contaminating plant tissue cultures. **Acta Agrobotanica**, v. 66, n. 4, p. 81–92, 2014.
- KHAN, T. et al. Molecular identification and control of endophytic contamination during *in vitro* plantlet development of *Fagonia indica*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, n. 8, p. 1–9, 2018.
- KULUS, D.; ZALEWSKA, M. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species - A review. **Scientia Horticulturae**, v. 168, p. 88–107, 2014.

- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger Datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.
- LANDRUM, L. R. *Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinium, and Luma* (Myrtaceae). **Flora Neotropica Monograph**, v. 45, p. 7–72, 1986.
- LIU, H. et al. Inner plant values: Diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–17, 2017.
- LONDE, L. C. N. et al. Phloroglucinol is effective for *in vitro* growth and multiplication of banana shoots and roots. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 13, n. 2, p. 34–40, 2017.
- LUBER, J. et al. Flora do Espírito Santo: *Campomanesia* (Myrtaceae). **Rodriguésia**, v. 68, n. 5, p. 1767–1790, 2017.
- MATSUMOTO, T. Cryopreservation of plant genetic resources: Conventional and new methods. **Reviews in Agricultural Science**, v. 5, p. 13–20, 2017.
- MAYRINCK, R. C.; VAZ, T. A. A.; DAVIDE, A. C. Classificação fisiológica de sementes florestais quanto à tolerância à dessecação e ao comportamento no armazenamento. **Cerne**, v. 22, n. 1, p. 85–92, 2016.
- MHAMDI, A.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen species in plant development. **Development**, v. 145, n. 15, 2018.
- MIGNOLET-SPRUYT, L. et al. Spreading the news: Subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 13, p. 3831–3844, 2016.
- MINDEN, V. et al. Antibiotics impact plant traits, even at small concentrations. **AoB PLANTS**, v. 9, n. 2, p. 1–19, 2017.
- MITTLER, R. ROS Are Good. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 1, p. 11–19, 2017.
- MONTEIRO, L. et al. Conservation priorities for the threatened flora of mountain top grasslands in Brazil. **Flora**, v. 238, p. 234–243, 2018.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 474–497, 1962.
- NOCTOR, G.; REICHHELD, J. P.; FOYER, C. H. ROS-related redox regulation and signaling in plants. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 80, p. 3–12, 2018.
- NORMAH, M. N.; SULONG, N.; REED, B. M. Cryopreservation of shoot tips of recalcitrant and tropical species: Advances and strategies. **Cryobiology**, v. 87, p. 1–14, 2019.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of criopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In: RUANE, J.; SONNINO, A. (Ed.). **The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources**. FAO. Rome: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), 2006. p. 61–78.

PENCE, V. C. et al. Survival and genetic stability of shoot tips of *Hedeoma todsenii* R.S.Irving after long-term cryostorage. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 53, n. 4, p. 328–338, 2017.

PINHEIRO, R. T.; MARCELINO, D. G.; MOURA, D. R. Espécies arbóreas de uso múltiplo e sua importância na conservação da biodiversidade nas áreas verdes urbanas de Palmas, Tocantins. **Desenvolvimento Meio Ambiente**, v. 49, p. 264–282, 2018.

PINTO, M. de S. et al. Cryopreservation of coffee zygotic embryos: Dehydration and osmotic rehydration. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 4, p. 380–389, 2016.

PRITCHARD, H. W. et al. Cryobiotechnology of tropical seeds – scale, scope and hope. **Acta Horticulturae**, v. 1167, p. 37–48, 2017.

PRUDENTE, D. d. O. et al. The cryoprotectant PVS2 plays a crucial role in germinating *Passiflora ligularis* embryos after cryopreservation by influencing the mobilization of lipids and the antioxidant metabolism. **Journal of Plant Physiology**, v. 239, p. 71–82, 2019.

PRUDENTE, D. O. et al. Germinação *in vitro* e criopreservação de sementes de Paineira-Rosa. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 15, n. 3, p. 272–276, 2016.

PRUDENTE, D. O. et al. Compatible solutes improve regrowth, ameliorate enzymatic antioxidant systems, and reduce lipid peroxidation of cryopreserved *Hancornia speciosa* Gomes lateral buds. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 53, n. 4, p. 352–362, 2017.

PRUDENTE, D. O.; PAIVA, R. Plant Cryopreservation: Biochemical aspects. **Journal Cell Developmental Biology**, v. 1, n. 1:2, p. 1–3, 2017.

QUAMBUSCH, M.; WINKELMANN, T. Bacterial Endophytes in Plant Tissue Culture: Mode of Action, Detection, and Control. In: VÍCTOR M. LOYOLA-VARGAS AND NEFTALÍ OCHOA-ALEJO (Ed.). **Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology**. New York: Humana Press, 2018. 1815p. 69–87.

REED, B. M. Plant cryopreservation: a continuing requirement for food and ecosystem security. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 53, p. 285–288, 2017.

REFLORA. **Campomanesia**. In: Flora do Brasil 2020 em construção. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em:
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10335>>. Acesso em: 09 de março 2020.

REIS, A. F.; SCHMIELE, M. Características e potencialidades dos frutos do Cerrado na indústria de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, p. 1–12, 2019.

RHODEN, S. A. et al. Phylogenetic analysis of endophytic bacterial isolates from leaves of the medicinal plant *Trichilia elegans* A. Juss. (Meliaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 1515–1525, 2015.

SÁ, S. et al. Phytochemistry and antimicrobial activity of *Campomanesia adamantium*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, n. 3, p. 303–311, 2018.

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

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Survival by vitrification of nucellar cells of Navel Orange (*Citrus sinensis* var. *brasiliensis* Tanaka) Cooled to -196 °C. **Journal of Plant Physiology**, v. 137, n. 4, p. 465–470, 1991.

SALLES, E. A. P. B. et al. Desinfestação e introdução *in vitro* de segmentos nodais de *Acacia mearnsii*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 37, n. 92, p. 485–491, 2017.

SALOMÃO, A. N. et al. Methods to assess the viability of cryopreserved *Jatropha curcas* L. seed germplasm. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 391–398, 2016.

SANT'ANA, C. et al. *In vitro* propagation of *Campomanesia rufa*: An endangered fruit species. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n. 4, p. 372–380, 2018.

SANTOS, F. C. et al. Desiccation sensitivity from different coffee seed phenological stages. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 1, p. 25–31, 2014.

SAVI, D. C.; ALUIZIO, R.; GLIENKE, C. Brazilian Plants: An unexplored source of endophytes as producers of active metabolites. **Planta Medica**, v. 85, n. 8, p. 619–636, 2019.

SILVA, D. L. da et al. Antioxidant capacity of Cerrado fruits. **Desafios**, v. 6, n. Especial, p. 127–133, 2019.

SILVA, D. P. C. da et al. *In vitro* conservation of ornamental plants. **Ornamental Horticulture**, v. 24, n. 1, p. 28–33, 2018.

SILVESTRE, G. J. S.; MIRANDA, S. C.; DE-CARVALHO, P. S. Levantamento das espécies de Myrtaceae Juss. na Serra do Abrante, Palmeiras de Goiás. In: MIRANDA, S. C. DE; DE-CARVALHO, P. S.; RIBON, A. A. (Ed.). **Tópicos em Conservação e Manejo do Cerrado: Biodiversidade, Solos e uso Sustentável**. Goiânia: Kelps, 2019. p. 31–64.

SOUSA, R. H. V. et al. Impairment of peroxisomal APX and CAT activities increases protection of photosynthesis under oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 2, p. 627–639, 2019.

- SOUZA, F. V. D. et al. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 124, n. 2, p. 351–360, 2016.
- STRECZYNSKI, R. et al. Current issues in plant cryopreservation and importance for *ex situ* conservation of threatened Australian native species. **Australian Journal of Botany**, v. 67, n. 22, p. 1–15, 2019.
- SUZUKI, A. B. P. et al. Criopreservação de sementes da orquídea brasileira em extinção *Cattleya granulosa* Lindl. **Iheringia, Série Botânica**, v. 73, n. 2, p. 146–150, 2018.
- TAHIR, H. A. S. et al. Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–11, 2017.
- TEIXEIRA, J. A.; DOBRÁNSZKI, J.; ROSS, S. Phloroglucinol in plant tissue culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 49, p. 1–16, 2013.
- VENDRAME, W. A.; FARIA, R. T. Phloroglucinol enhances recovery and survival of cryopreserved *Dendrobium nobile* protocorms. **Scientia Horticulturae**, v. 128, n. 2, p. 131–135, 2011.
- XIE, Y. et al. Effect of cytoskeleton on ice crystal growth in cells during freezing. **International Journal of Food Properties**, v. 21, n. 1, p. 2400–2410, 2018.
- ZUNINGA, A. et al. Capacidade antioxidantes de frutos nativos do Cerrado (*Hancornia speciosa*, *Campomanesia xanthocarpa*, *Eugenia dysenterica*): uma breve revisão. **Desafios**, v. 5, n. 1, p. 128–134, 2018.

CAPITULO 1: Germinação *in vitro* e criopreservação de *Campomanesia rufa* (O. Berg)
Nied.

RESUMO

Campomanesia rufa (O. Berg) Nied. (Myrtaceae) possui potencial econômico. Porém é uma espécie em perigo de extinção. Portanto, a conservação a longo prazo mediante a criopreservação é uma alternativa de preservação da diversidade. No entanto, para o seu sucesso, precisa-se de protocolos eficientes de micropropagação *in vitro*. Desse modo, objetivou-se a otimização das metodologias de micropropagação *in vitro* visando a criopreservação de ápices caulinares e sementes. Para isto, foi avaliado o efeito do corte distal nas sementes e diferentes concentrações de sais no meio de cultura MS (100, 50 ou 25%), assim como o efeito de concentrações de sacarose (0, 15, 30 ou 45 g L⁻¹) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (0, 20, 40, 80 ou 160 mg L⁻¹) na germinação. Por sua vez, na criopreservação se utilizou dois tipos de explantes e técnicas: sementes mediante a técnica de desidratação, e ápices caulinares mediante a técnica de *droplet vitrification*. Sementes criopreservadas e não criopreservadas foram submetidas a análises bioquímicas enzimáticas e não enzimáticas, assim como análises ultraestruturais. Os resultados demonstraram que o corte distal e o meio MS 100% foram mais eficientes para a germinação (86,67±6,26%). A sobrevivência à criopreservação de sementes (10±3,94%) foi superior à criopreservação em ápices caulinares (0%). As análises enzimáticas (SOD e CAT) mostraram baixa atividade e teor de peróxido de hidrogênio, enquanto a peroxidação lipídica mostrou-se alta. As análises ultraestruturais demonstraram lesões nos embriões causadas pela criopreservação. Desta forma, otimizou-se o protocolo de germinação *in vitro* mediante corte distal das sementes, bem como a criopreservação das sementes.

Palavras-chaves: Criopreservação. Nanotubos de carbono. Bioquímicas.

ABSTRACT

Campomanesia rufa (O. Berg) Nied. (Myrtaceae) has economic potential. However, it is a species in danger of extinction. Therefore, long-term conservation through cryopreservation is an alternative for preserving diversity. However, for its success, efficient *in vitro* micropropagation protocols are needed. Thus, the objective was to optimize *in vitro* micropropagation methodologies aiming at the cryopreservation of stem apexes and seeds. For this, the effect of distal cutting on seeds and different concentrations of salts in the MS culture medium (100, 50 or 25%) was evaluated, as well as the effect of sucrose concentrations (0, 15, 30 or 45 g L⁻¹) and multi-walled carbon nanotubes (0, 20, 40, 80 or 160 mg L⁻¹) during germination. In turn, in cryopreservation two types of explants and techniques were used: seeds through dehydration technique, and stem apexes through droplet vitrification technique. Cryopreserved and non-cryopreserved seeds were subjected to enzymatic and non-enzymatic biochemical analyzes, as well as ultrastructural analyzes. The results showed that the distal cut and the 100% MS medium were more efficient for germination ($86.67 \pm 6.26\%$). Survival to cryopreservation of seeds ($10 \pm 3.94\%$) was superior to cryopreservation in stem apexes (0%). Enzymatic analyzes (SOD and CAT) showed low activity and low content of hydrogen peroxide, meanwhile lipid peroxidation showed a high level. Ultrastructural analyzes showed lesions in the embryos caused by cryopreservation. In this way, distal cutting of the seeds, as well as the cryopreservation of the seeds optimized *in vitro* germination protocol.

Keywords: Criopreservation. Carbon nanotubes. Biochemicals.

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Campomanesia rufa* conhecida como casaqueira ou gabiroba de árvore apresenta potencial agrícola, alimentício, medicinal e ornamental (SANTOS et al., 2013; ZUNINGA et al., 2018; CARVALHO et al., 2019). No entanto, devido à constante deterioração de seu habitat por ação antrópica se encontra na *Red List* da IUCN-*International Union for Conservation of Nature* (2020). Além disso, são escassos os estudos sobre a sua propagação (SANT'ANA et al., 2018) e conservação.

Para que ocorra o sucesso da propagação *in vitro* é necessária a interação de fatores como o tipo de meio, os suplementos, o controle das condições ambientais e os fatores fisiológicos intrínsecos da planta (IKENGANYIA et al., 2017). No entanto, a seleção do meio de cultura basal é um dos fatores mais relevantes para cultivos *in vitro*.

Nessa perspectiva, o meio MS é muito usado para diferentes espécies, embora apresente uma elevada concentração de sais minerais (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Ainda nessa ótica, o uso de sacarose como fonte de carbono contribui para o equilíbrio do potencial osmótico no meio de cultura e maximiza a germinação, permitindo a obtenção de plântulas com elevado vigor (ANTUNES et al., 2018; BATISTA; DUARTE; BINOTTI, 2018).

Por outro lado, auxiliando nos processos de germinação, o uso de nanomateriais como os nanotubos de carbono favorecem a germinação nas sementes mediante a entrada de água e oxigênio na célula por meio de ativação de aquaporinas (KIM; GOPAL; SIVANESAN, 2017). Do mesmo modo, podem alterar as propriedades morfológicas e fisiológicas das células vegetais, auxiliando no crescimento da planta (FATHI et al., 2017). Além disso, aumentam a absorção de minerais (K, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn) atribuídos ao maior número e tamanho das raízes, para melhorar o crescimento (JOSHI et al., 2018).

Protocolos de desinfestação e micropropagação *in vitro* são essenciais para a realização de conservação em longo prazo, como a criopreservação (ENGELMANN, 2011; SANT'ANA et al., 2018). A criopreservação consiste em expor os explantes (sementes, tecidos e embriões) a ultrabaixas temperaturas (-196 °C) atingidas mediante o uso do nitrogênio líquido (ENGELMANN, 2011). É uma alternativa para conservar espécies em perigo de extinção, como a *C. rufa* (ENGELMANN, 2011). Porém, até o momento não há registro da criopreservação da espécie.

O uso de sementes como explantes para fins de conservação de uma espécie, seja pela criopreservação ou armazenamento em bancos de sementes, é adequado por serem sistemas organizados (PRITCHARD et al., 2017). Porém, algumas espécies do gênero *Campomanesia* apresentam germinação lenta e desuniforme (MAYRINCK; VAZ; DAVIDE, 2016; BARBEDO, 2018; SANT'ANA et al., 2018).

Sendo assim, como alternativas temos o uso de ápices caulinares como explantes, uma vez que também têm se mostrado uma alternativa eficiente para a conservação de espécies. Os ápices caulinares, por guardarem uma parte de tecido meristemático em sua extremidade, não apresentam ligação vascular com os demais tecidos, proporcionando explantes livre de patógenos (NORMAH; SULONG; REED, 2019).

De forma complementar, a obtenção de protocolos eficientes de criopreservação é auxiliada por análises bioquímicas (CHEN et al., 2015). Espécies vegetais submetidas à temperatura ultrabaixa ativam seus sistemas antioxidantes enzimáticos como: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX), e não enzimático como: peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica, ácido ascórbico (AsA) e glutathione reduzida (GSH) (CHEN et al., 2015) para manter a homeostase celular (STRECZYNSKI et al., 2019).

Assim, o uso de criopreservação depende da prevenção de danos principalmente nas membranas por causa da formação de cristais de gelo (PANIS; LAMBARDI, 2006). Por essa razão, um fator importante que auxilia na criopreservação é a utilização de crioprotetores. Os crioprotetores protegem o explante de condições adversas (SANTOS et al., 2015). Os crioprotetores utilizados, com frequência, são combinados em uma solução denominada *Plant Vitrification Solution 2* (PVS2) (PRUDENTE et al., 2016).

O PVS2 apresenta entre seus componentes o dimetilsulfóxido (DMSO), o qual é muito tóxico em temperatura ambiente e também apresenta toxicidade dependendo do tempo de exposição a 0 °C (FAHY; WOWK, 2015). Por isso, protocolos visam definir o tempo adequado de exposição ao DMSO (PRUDENTE; PAIVA, 2017).

Adicionalmente, o uso de floroglucinol junto ao PVS2 resultou em sobrevivência até duas vezes maior de procormos de *Dendrodium nobile* (VENDRAME; FARIA, 2011) e melhorou a criopreservação de *Hypericum perforatum* (BRUŇÁKOVÁ; ČELLÁROVÁ, 2016). Tais fatos sugerem o floroglucinol como alternativa para melhorar as chances de sucesso da criopreservação de *C. rufa*.

Portanto, objetivou-se a otimização das metodologias de propagação *in vitro* mediante o uso de sementes, bem como de conservação de germoplasma vegetal de *C. rufa* em nitrogênio líquido. A concretização destas metas é de suma importância para a preservação da biodiversidade vegetal de uma espécie em perigo de extinção e alto potencial econômico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e desinfestação

As plantas da espécie *Campomanesia rufa* utilizadas na pesquisa foram coletadas de uma população natural de Minas Gerais, Brasil, localizadas a 21°13'35.5"S 44°59'00.7"W. A identificação correta da espécie se realizou mediante verificação cruzada com plantas mantidas no Herbário ESAL, localizado no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, com o número de coleção ESAL21198.

Frutos maduros de *C. rufa* foram coletados, lavados com água corrente e detergente, seguida pela extração das sementes. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas pela imersão em álcool 70% por um período de 30 segundos, seguida pela imersão em solução de hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo por 20 minutos. Posteriormente, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada-esterilizada para a remoção do excesso de desinfetante (SANT'ANA et al., 2018). Após o processo de assepsia, as sementes seguiram para os experimentos de germinação *in vitro*.

2.2 Germinação *in vitro* das sementes de *Campomanesia rufa*

2.2.1 Com ou sem corte distal em diferentes concentrações de sais do meio de cultura

As sementes, com ou sem corte distal, foram inoculadas nos meios de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) a 100, 50 e 25% da concentração de sais. Os meios de cultura foram suplementados com sacarose a 30 g L⁻¹, o pH ajustado a 5,8, adicionou-se 2,5 g L⁻¹ de Phytigel[®] e, posteriormente, autoclavados a 121 °C e 1,5 atm por 20 minutos (SANT'ANA et al., 2018).

2.2.2 Diferentes concentrações de sacarose na germinação

Sementes desinfestadas com corte distal foram inoculadas nos meios de cultura MS. Cada meio de cultura foi suplementado com 0, 15, 30 ou 45 g L⁻¹ de sacarose. Aferiu-se o pH para 5,8 e adicionou-se 2,5 g L⁻¹ de Phytigel[®]. Posteriormente, autoclavou-se a 121 °C e 1,5 atm por 20 minutos.

2.2.3 Nanotubos de carbono no cultivo *in vitro* de sementes

As concentrações (0, 20, 40, 80 e 160 mg L⁻¹) de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, funcionalizado com ácido carboxílico (Sigma-Aldrich), foram adicionadas aos meios de cultura MS. Os meios de cultura foram suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose, o pH ajustado para 5,8 e adicionado 2,5 g L⁻¹ de Phytigel[®]. Depois, autoclavado a 121 °C e 1,5 atm por 20 minutos (SANT'ANA et al., 2018). Posteriormente, as sementes com corte distal foram inoculadas nos meios de cultura.

2.2.4 Condições de cultivo e respostas analisadas

Após a inoculação das sementes para germinação, as placas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25±2 °C sob fotoperíodo de 16 horas de luz com irradiância de 36 µmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas. Cada tratamento se consistiu em 30 repetições organizados em delineamento inteiramente casualizado. Cada semente contou como uma repetição. O percentual de germinação foi avaliado aos 30 dias. Considerou-se a semente germinada quando a radícula e o hipocótilo surgiram e cresceram a um comprimento de pelo menos 2 mm.

2.3 Criopreservação de sementes

2.3.1 Determinação de teor de umidade

Realizou-se segundo a metodologia prescrita nas Regras para Análise de Sementes-RAS (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2009), utilizando-se o método da estufa, a 105 ±

3 °C, por 24 horas, com três repetições de 50 sementes. Procedeu-se o monitoramento da perda de água mediante a determinação do peso inicial das sementes, antes da desidratação com sílica gel. O peso seco obteve-se depois que as sementes foram colocadas em recipientes fechados (Gerbox[®]) contendo 80 g de sílica gel e submetidas a diferentes tempos de desidratação (60, 120, 180, 240 e 300 minutos) na câmara de fluxo laminar de ar. O tratamento controle se constituiu de sementes não desidratadas. Para cada tempo de desidratação usou-se a fórmula: Teor de umidade (%) = [(peso úmido - peso seco) x 100] / peso úmido.

2.3.2 Criopreservação

Sementes foram colocadas em placas Petri sobre a sílica gel (80 g) acondicionadas em caixas Gerbox[®] por diferentes tempos de desidratação (0, 60, 120, 180, 240 ou 300 minutos) em câmara de fluxo laminar. Os grupos controle foram constituídos por sementes não imersas no nitrogênio líquido. Sementes desidratadas, depois de passar pelos diferentes tempos de desidratação foram colocadas em criotubos (2 mL) e imersas em botijões criogênicos por imersão direta em nitrogênio líquido a -196 °C por pelo menos 1 hora.

Posteriormente, as sementes imersas no nitrogênio líquidos (criopreservadas) foram submetidas ao descongelamento, colocando-se os criotubos em banho-maria a 40 °C por 2 minutos. Após o descongelamento, as sementes foram transferidas para o meio de regeneração e transferidas para a sala de crescimento sob condições controladas de temperatura (25 ± 2 °C) durante 24 horas e em ausência de luz. O meio de regeneração consistiu no meio de cultura MS suplementado com 166,67 g L⁻¹ de sacarose, 2,5 g L⁻¹ de Phytigel[®] e pH 5,8; e depois autoclavado a 121 °C e 1,5 atm por 20 minutos.

Posteriormente, as sementes foram transferidas ao meio de germinação. O meio de germinação se consistiu no meio de cultura MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 2,5 g L⁻¹ de Phytigel[®] e pH 5,8; e depois autoclavado a 121 °C e 1,5 atm por 20 minutos.

As sementes permaneceram mais 7 dias em ausência de luz e sob condições controladas de temperatura (25 ± 2 °C). Depois os tratamentos foram transferidos para a sala de crescimento sob condições controladas de temperatura (25 ± 2 °C) e fotoperíodo de 16 h de luz com intensidade de luz de 35 μmol m⁻² s⁻¹.

Cada tratamento se consistiu em 30 repetições. Cada semente foi considerada uma repetição. Avaliou-se a sobrevivência aos 90 dias.

2.3.3 Análises bioquímicas

Análises bioquímicas enzimáticas

Amostras de 0,2 g de sementes ao longo dos tempos de desidratação (0, 60, 120, 180, 240 e 300 min) criopreservadas ou não criopreservadas serviram para a obtenção de um extrato enzimático para as análises da dismutase do superóxido (SOD; EC 1.15.1.1) e catalase (CAT; EC 1.11.1.6). Da mesma forma, o grupo controle foi constituído por sementes não imersas no nitrogênio líquido.

O extrato enzimático foi obtido pela cominuição do material biológico em nitrogênio líquido com polivinilpolipirrolidona (PVPP). Posteriormente, foram adicionados 1,5 mL do tampão de extração contendo: 1,47 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), 15 µL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,1 M (pH 7,0), 6 µL de ditioneitol (DTT) 0,5 M, 12 µL de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0,1 M, ácido ascórbico 0,001 M e 22 mg de PVPP. O extrato foi centrifugado a 12.000 g por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi coletado, armazenado e transferido para um ultra-freezer -80 °C, onde ficou armazenado até a realização das análises enzimáticas (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998).

Atividade da SOD

As atividades desta enzima foram avaliadas pela capacidade de inibição da fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). A 100 µL do extrato enzimático foram adicionados 1,9 mL do meio de incubação: tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 µM, água esterilizada 30 µL, NBT 75 µM e riboflavina 2 µM.

As amostras foram iluminadas com lâmpada fluorescente de 20 W (o controle foi mantido no escuro e sem a adição do extrato). Após 10 minutos, as amostras foram analisadas a 560 nm e o cálculo da atividade enzimática foi feito com a seguinte equação: % de inibição = $(A_{560} \text{ amostra com o extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem enzima}) / A_{560} \text{ controle sem enzima}$.

Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

Atividade da CAT

A atividade da enzima CAT foi avaliada utilizando uma alíquota de 100 µL do extrato enzimático, onde se adicionou 1400 µL de meio de incubação contendo: 900 µL de fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) e 500 µL de peróxido de hidrogênio 0,97 mM, incubados a 28 °C (HODGES, 1997).

A cada 15 segundos, durante três minutos, foi avaliado o decaimento da absorbância, a 240 nm, pelo consumo do H₂O₂. O coeficiente de extinção molar foi de 36 mM⁻¹ cm⁻¹.

Análises bioquímicas não enzimáticas

Quantificação de peróxido de hidrogênio

Amostras de 0,2 g das sementes desidratadas ao longo dos tempos de desidratação (0, 60, 120, 180, 240 e 300 min) criopreservadas ou não criopreservadas foram maceradas em nitrogênio líquido, homogeneizadas em 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) e centrifugadas, a 12.000 g por 15 minutos, a 4° C. O H₂O₂ foi determinado medindo-se a absorbância a 390 nm em um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, 500 µL do extrato e 1 mL de iodeto de potássio (VELIKOVA; YORDANOV; EDREVA, 2000). Da mesma forma, o grupo controle foi constituído por sementes não imersas no nitrogênio líquido.

Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA) (BUEGE; AUST, 1978). Amostras de 0,2 g de sementes desidratadas ao longo dos tempos de desidratação (0, 60, 120, 180, 240 e 300 min) criopreservadas ou não criopreservadas foram maceradas em nitrogênio líquido acrescido de 20% de PVPP (m/v) e homogeneizadas em 1,5 mL TCA 0,1% (m/v). O homogeneizado foi

centrifugado a 10.000 g, por 10 minutos. Da mesma forma, o grupo controle foi constituído por sementes não imersas no nitrogênio líquido. Aliquotas de 250 µL do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação (0,5% (m/v) de TBA e 10% (m/v) de TCA. Incubou-se a 95 °C por 30 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e as leituras foram determinadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm. O malondialdeído (MDA), produto secundário de baixa massa molecular do processo de peroxidação foi formado a partir do TBA.

A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação: $[MDA] = (A_{535} - A_{600}) / (\xi \cdot b)$, em que: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento ótico=1). A peroxidação foi expressa em nmol de MDA g⁻¹ de matéria fresca.

2.3.4 Análise ultraestrutural

Sementes submetidas a diferentes tempos de desidratação, criopreservadas ou não, foram fixadas em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,0% em tampão de cacodilato de sódio 0,05 M, CaCl₂ 0,001 M, pH 7,2) por um período mínimo de 24 horas a 4 °C. Do mesmo modo, as sementes do tratamento controle. A transferência de sementes para a solução fixadora realizou-se na capela de exaustão. Após a fixação as sementes foram colocadas em glicerol 30% por 30 minutos e fraturadas em nitrogênio líquido com auxílio de uma superfície metálica e bisturi. Posteriormente, as amostras foram lavadas em água destilada e desidratadas em gradiente de acetona (25, 50, 75, 90 e 100%), permanecendo por dez minutos em cada concentração e três vezes por dez minutos na concentração 100%. As amostras foram tratadas em aparelho de ponto crítico Balzers CPD 030, onde a acetona foi substituída por CO₂. As amostras foram metalizadas com ouro com auxílio do aparelho *sputtering* Balzers SCD 050, e então foram observadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss LEO EVO 40.

2.4 Droplet vitrification de ápices caulinares

Os ápices caulinares de 0,5 cm aproximadamente foram seccionados em câmara de fluxo laminar com bisturi, a partir de brotos de *C. rufa* de 6 cm de altura estabelecidos *in vitro*. Os ápices caulinares foram incubados no meio de pré-tratamento. O meio de pré-

tratamento consistiu em meio MS com vitaminas, suplementado com 166,67 g L⁻¹ de sacarose ou 166,67 g L⁻¹ de manitol, 2,5 g L⁻¹ de Phytigel[®] e pH 5,8; e depois autoclavado a 121 °C e 1,5 atm, por 20 minutos. O material *in vitro* foi mantido em sala de crescimento durante 48 horas à temperatura de 25 °C e sob escuro. Utilizou-se 15 ápices caulinares por tratamento.

Em câmara de fluxo laminar, os ápices caulinares foram imersos em *loading solution* [glicerol 2 M + 133,33 g L⁻¹ de sacarose em MS líquido] (MATSUMOTO; SAKAI; YAMADA, 1994) durante 20 minutos a 25 °C. Depois, os explantes foram removidos e acomodados em tiras de papel alumínio (1,5 x 0,5 cm) com uma gota de solução de PVS2 [30% de glicerol + 15% etileno glicol + 15% DMSO + 133,33 g L⁻¹ de sacarose em MS líquido] (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990) ou PVS2 adicionando de 1% floroglucinol, ambos a 0 °C, por diferentes períodos (15, 30 e 60 minutos) antes da imersão em nitrogênio líquido.

No tratamento controle, usou-se ápices caulinares não imersos em nitrogênio líquido (não passaram pela etapa de criopreservação), mas passaram por todos os demais processos da criopreservação. As tiras de papel alumínio foram colocadas em criotubos e imersas em nitrogênio líquido (-196 °C) durante pelo menos uma hora. Após a etapa de congelamento, os explantes foram retirados do PVS2 e descongelados em *Recovery Solution* (RS) [400 g L⁻¹ sacarose dissolvida em MS líquido (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990)] a 25 °C durante 20 minutos (descongelamento rápido). Posteriormente, os explantes foram incubados em meio de regeneração.

O meio de regeneração foi constituído por sais do meio MS, suplementado com 100 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 2,5 g L⁻¹ de Phytigel[®]. Antes da inclusão do Phytigel[®] o pH do meio foi ajustado para 5,8 e em seguida autoclavado a 121 °C e 1,5 atm, por 20 minutos.

O material *in vitro* foi mantido em sala de crescimento durante 24 horas na ausência de luz, à temperatura 25±2 °C. Posteriormente, os explantes foram inoculados em meio de multiplicação.

O meio de multiplicação foi constituído por sais do meio MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 2,5 g L⁻¹ de Phytigel[®], 5,6 µM de Benzilaminopurina (BAP), pH ajustado para 5,8 antes da adição do Phytigel[®] e autoclavado a 121 °C e 1,5 atm, por 20 minutos (SANT'ANA et al., 2018). Os explantes foram mantidos por mais sete dias no escuro e então transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, sob irradiância de 36 µmol

$\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de 25 ± 2 °C. Avaliou-se após 7 dias a percentagem de sobrevivência dos explantes.

2.5 Análises Estatísticas

Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram analisadas a 5% de probabilidade ou por regressão ou pelo teste de Scott-Knott quando a regressão não foi significativa. As análises estatísticas foram realizadas no software estatístico R versão 3.5.2 (R CORE TEAM, 2019) utilizando o pacote ExpDes.pt (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2013).

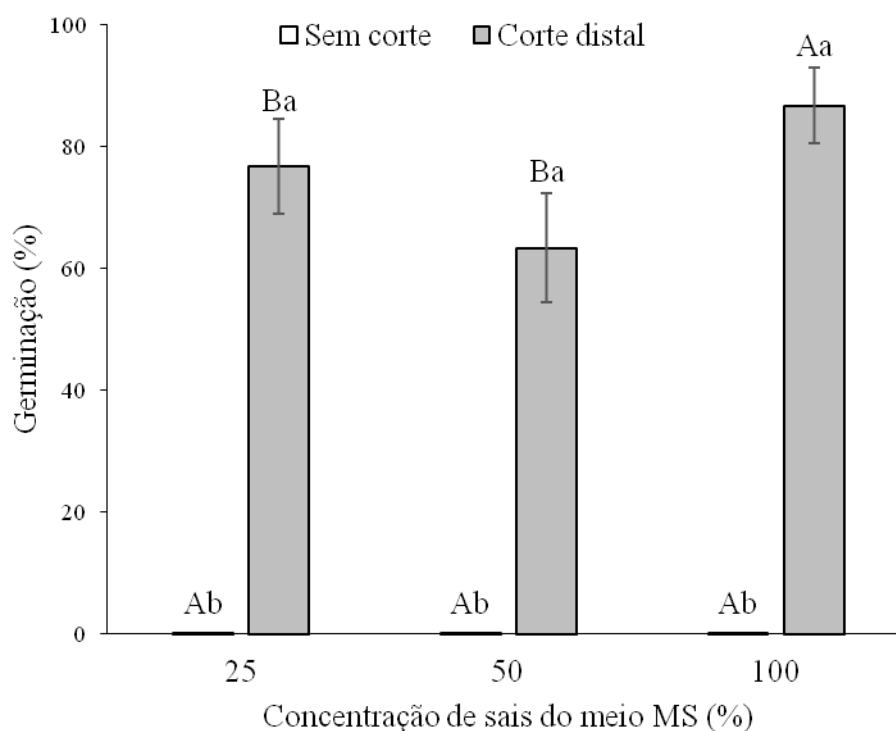
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Germinação *in vitro* das sementes de *Campomanesia rufa*

3.1.1 Com ou sem corte distal em diferentes concentrações de sais do meio de cultura

A germinação foi significativamente maior ($p > 0,05$) sob o tratamento de corte distal e com 100% da concentração de sais do meio MS (86,67%) do que nos demais tratamentos. As sementes sem corte não germinaram em nenhuma das concentrações de sais do meio MS aos 30 dias de cultivo (Figura 1).

Figura 1 - Influência do corte distal e da concentração de sais do meio MS na germinação de *C. rufa* aos 30 dias de cultivo.



Legenda: Letras maiúsculas iguais não diferem entre si ao longo das concentrações, conforme teste Skott-Knott ao nível de 5%. Letras minúsculas iguais não diferem entre si em uma mesma concentração, conforme teste Skott-Knott ao nível de 5%.

Na pesquisa, obteve-se 86,67% de germinação (Figura 1), que foi similar à germinação de sementes de *Eugenia dysenterica* aos 31 dias (86,25%), mediante a remoção completa do tegumento (MARTINOTTO et al., 2007).

O tegumento pode servir como uma barreira física, a qual reduz a absorção de gases e afeta a taxa de absorção de água e nutrientes pela semente. Da mesma forma, o tegumento pode possuir compostos fenólicos que inibem a germinação (PINHAL et al., 2017; FREITAS et al., 2019).

Similarmente, a germinação também foi afetada pela concentração de sais do meio MS (Figura 1). O meio MS utilizado para a maioria das espécies vegetais apresenta, em relação aos demais meios formulados, uma alta concentração iônica, com alta concentração de nitrogênio, potássio, zinco e cloro (MURASHIGE; SKOOG, 1962). O corte distal do tegumento provavelmente permitiu a absorção dos nutrientes, proporcionando alta percentagem de germinação (Figura 1).

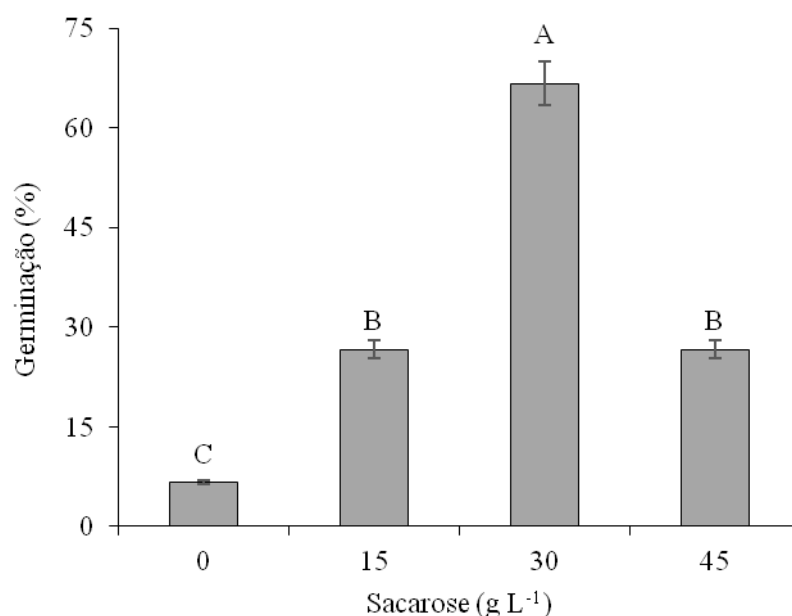
Adicionalmente, deve-se levar em consideração que a qualidade das sementes coletadas *in situ* é influenciada pelas condições adversas do ambiente (LEÃO-ARAÚJO et al., 2019b). Estas condições influenciam no tamanho das sementes e na determinação do desenvolvimento e crescimento dos embriões, resultando em uma ampla variação na percentagem de germinação (LEÃO-ARAÚJO et al., 2019b), como foi observado nos últimos dois anos em que a pesquisa foi conduzida.

Apesar do manuseio da semente para a retirada do tegumento ser laborioso e consumir bastante tempo, este esforço é recompensado por acelerar e aumentar a uniformidade da germinação.

3.1.2 Germinação *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose

A concentração de sacarose influenciou a germinação, sendo 30 g L⁻¹ a que mais favoreceu a germinação (Figura 2).

Figura 2 - Influência da concentração de sacarose na germinação de *C. rufa* aos 30 dias de cultivo.



Legenda: Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) pelo teste Scott-Knott.

Quanto à fonte de carbono, concentrações de sacarose são fundamentais, uma vez que influenciam nos processos metabólicos, no crescimento e diferenciação dos tecidos devido a sua rápida hidrólise, apresentando translocação na planta (PAVEI et al., 2018). Além disso, mantêm a osmolaridade adequada no meio (SANTOS; SANTOS, 2019). Assim, a concentração de sacarose de 30 g L⁻¹ influenciou mais positivamente na germinação de *C. rufa* (66,67%) (Figura 2).

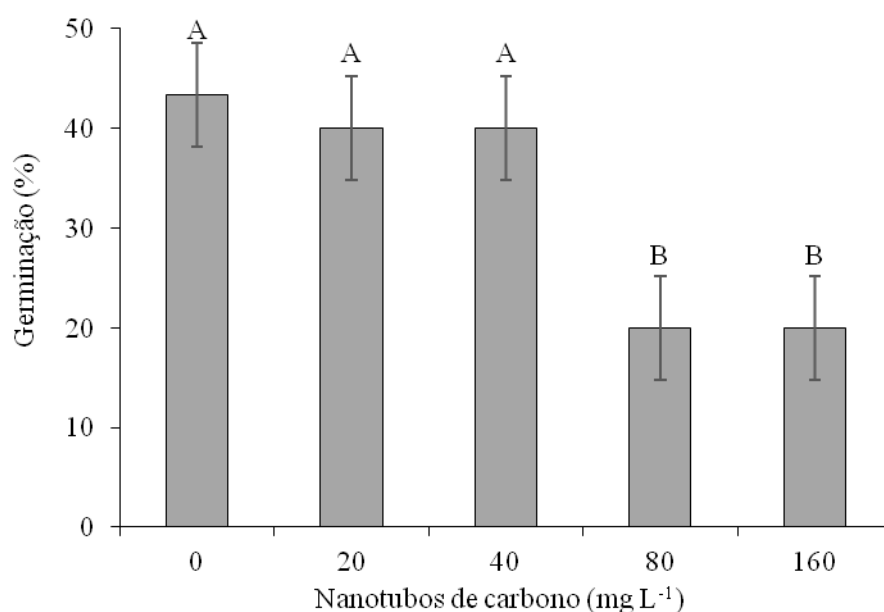
Por outro lado, os usos da mais alta (45 g L⁻¹) e baixa concentração (15 g L⁻¹) de sacarose mostraram percentagens de germinação abaixo de 30%. Assim, no tratamento controle a percentagem foi menor de que 15% (Figura 3). Contrariamente, na *Myrciaria dúbia* a ausência de sacarose influenciou positivamente no comprimento, massa seca e massa fresca das plântulas. Além disso, apresentou influência negativa com aumento na concentração de sacarose (30, 60 e 90 g L⁻¹) (SANTOS; SANTOS, 2019).

Altas concentrações de sacarose no meio de cultura podem causar estresse hídrico (PRUDENTE et al., 2016). Por essa razão, determinar o órgão, estágio de desenvolvimento e espécie proporcionam o sucesso no estabelecimento de plântulas *in vitro*, assim como os fatores que afetam à germinação de sementes de cada espécie (PRUDENTE et al., 2016).

3.1.3 Nanotubos de carbono na germinação *in vitro* de sementes

Pesquisas sobre o uso de nanopartículas na germinação de *C. rufa* não existem. Assim, neste trabalho, a concentração crescente de nanotubos de carbono até 40 mg L⁻¹ não influenciou negativamente na germinação de *C. rufa* aos 30 dias de cultivo, segundo a comparação com o controle. Entretanto, as concentrações mais altas (80 e 160 mg L⁻¹) reduziram em mais de 50% a germinação (Figura 3).

Figura 3 - Influência da concentração de nanotubos de carbono na germinação de *C. rufa* aos 30 dias de cultivo.



Legenda: Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) pelo teste Scott-Knott.

O uso de nanotecnologia tem crescido na última década, inclusive na agricultura (MITTAL et al., 2015). Nanopartículas auxiliam a germinação de sementes, crescimento das plantas e modulam a interação planta-ambiente ao nível celular e molecular. Porém, pesquisas apontam também a resultados negativos (AGATHOKLEOUS et al., 2019) ou sem efeitos na planta (DOĞAROĞLU; KÖLELİ, 2016).

Espécies como *Dodonaea viscosa* aumentaram a germinação com o uso de nanotubos de carbono (YOUSEFI; KARTOOLINEJAD; NAGHDI, 2017). Conseguiu-se o melhor efeito a 30 mg L⁻¹ de nanotubos de carbono, onde além da germinação, o tempo médio de

germinação foi diminuído, o comprimento da raiz e do caule, assim como os pesos fresco e seco de raiz e caule foram aumentados. Sobretudo, o uso de 50 e 100 mg L⁻¹ nanotubos de carbono de paredes múltiplas em condições de seca favoreceram a sobrevivência das plantas (YOUSEFI; KARTOOLINEJAD; NAGHDI, 2017).

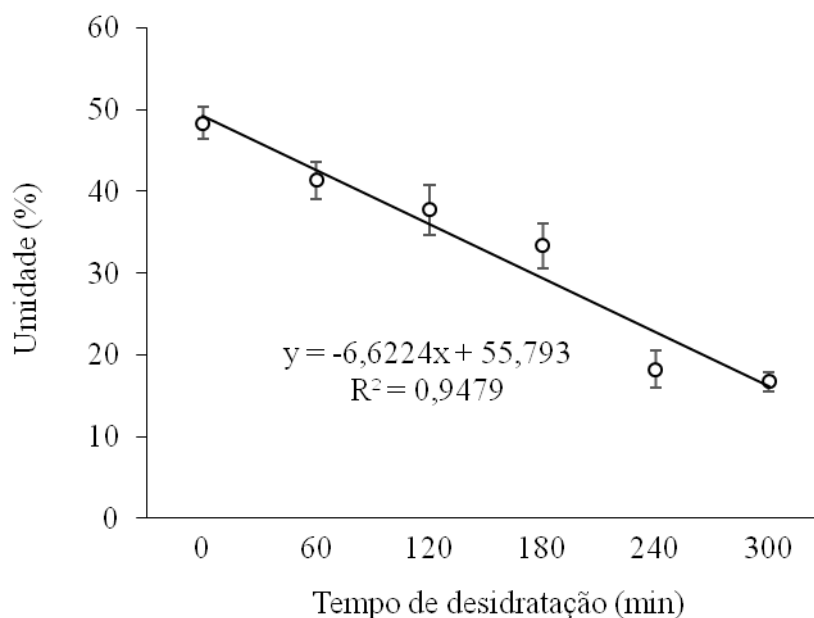
No entanto, efeitos tóxicos em relação à morte celular e vazamento de eletrólitos em diferentes espécies de interesse comercial foram relatados (TIWARI et al., 2014). Nessa perspectiva, cultivos hidropônicos de espinafre vermelho e alface foram os mais sensíveis aos nanotubos de carbono de paredes múltiplas, seguidos de arroz e pepino. Muito pouco ou nenhum efeito tóxico foi observado no pimentão e na soja. As concentrações 20 e 200 mg L⁻¹ não afetaram o desenvolvimento das raízes e brotos enquanto que 1000 e 2000 mg L⁻¹ foram tóxicas (BEGUM; IKHTIARI; FUGETSU, 2014).

3.2 Criopreservação de sementes

3.2.1 Determinação de teor de umidade

As sementes foram secas a uma taxa constante estimada de 7,81% por hora, atingindo 16,71% de umidade após 5 horas de desidratação com sílica gel, conforme descrito pela regressão abaixo (Figura 4).

Figura 4 - Regressão representativa da umidade das sementes de *Campomanesia rufa* ao longo do tempo de desidratação.

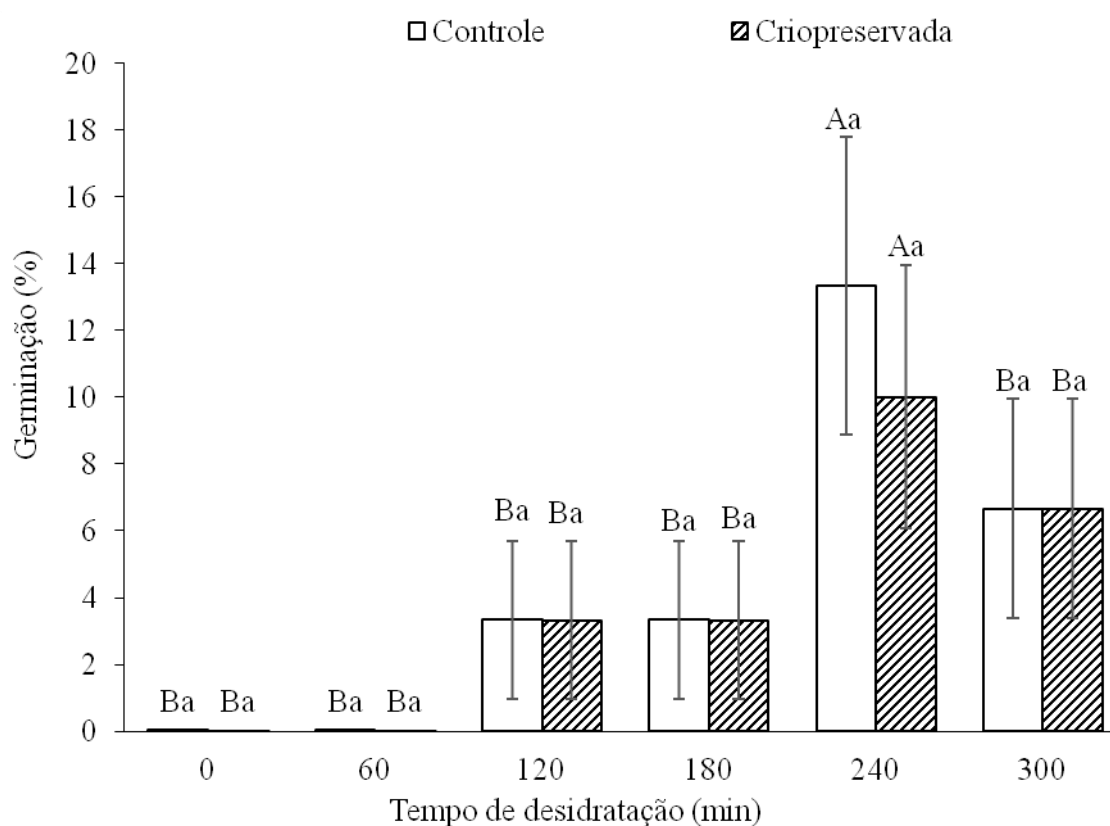


A dessecação de sementes influencia no processo de germinação. Porém, as sementes apresentam diferentes níveis de sensibilidade à dessecação, dependendo do teor de umidade (BADOU; YEDOMONHAN, 2017; FERNANDES et al., 2019). O teor de umidade é um aspecto importante para processos de conservação a longo prazo como a criopreservação, sobretudo em espécies recalcitrantes ou intermediárias como as do gênero *Campomanesia* (CAMPOS et al., 2014; GOELZER et al., 2019; LEÃO-ARAÚJO et al., 2019a, 2019b).

3.2.2 Criopreservação

Sementes sem corte, tanto controle quanto criopreservadas, germinaram apenas após 120 minutos de desidratação. Estes mesmos tratamentos atingiram o seu máximo de germinação (13,33 e 10%, respectivamente) aos 240 minutos de desidratação, não se diferenciando entre si. Conforme a desidratação prosseguiu e a consequente diminuição da umidade acontecia (Figura 4), houve um significativo aumento na germinação (Figura 5).

Figura 5 - Percentual de germinação de *C. rufa* ao longo do tempo de desidratação.



Legenda: Letras maiúsculas iguais não diferem entre si ao longo das concentrações, conforme teste Skott-Knott ao nível de 5%. Letras minúsculas iguais não diferem entre si em uma mesma concentração, conforme teste Skott-Knott ao nível de 5%.

As células vegetais possuem alta quantidade de água, a qual pode se converter em cristais de gelo, danificar as membranas e levar ao extravasamento do meio intracelular (PRITCHARD et al., 2017). Para evitar a formação de cristais de gelo, a água das células precisa ser retirada do explante vegetal, consequentemente, causando o aumento de solutos e afetando o estado metabólico das células (CEJAS et al., 2016).

As sementes de *C. rufa* que passaram por desidratação e criopreservação até 60 minutos não germinaram (Figura 5). A germinação nula no controle, onde a percentagem de umidade é a mais alta (Figura 4), pode ser devido a ampla faixa de tempo para a germinação *in vitro* da *C. rufa* (de 30 a 90 dias) (SANT'ANA et al., 2018).

Por essa razão, deve-se considerar o lote das sementes coletadas, o tempo de coleta, as condições geográficas e edafoclimáticas no período de formação dos frutos da planta. A influência no percentual de umidade pode variar dentro de uma mesma espécie (AQUILA; FERREIRA, 1984; HONG; ELLIS, 1996).

Por outro lado, as mais altas percentagens de germinação foram atingidas no tempo de desidratação de 240 minutos, tanto nas sementes criopreservadas como não criopreservadas, com 10,00 e 13,33% respectivamente (Figura 5), a um teor de umidade de 18,23% (Figura 4). Entretanto, a faixa de umidade adequada para processos de criopreservação é de 4,3 a 6% (CAVALCANTI-MATA, 2001; ENGELMANN, 2011).

Sementes de *Zinnia elegans* podem ser dessecadas até graus de umidade em torno de 4%, e criopreservadas sem perda do poder germinativo (PRUDENTE et al., 2015). Por outro lado, respostas genético-dependentes após a criopreservação têm sido observadas para outras espécies (SOUZA et al., 2016). Assim, todos os tratamentos de desidratação e criopreservação indicam que as sementes de *C. rufa* são sensíveis a esses processos.

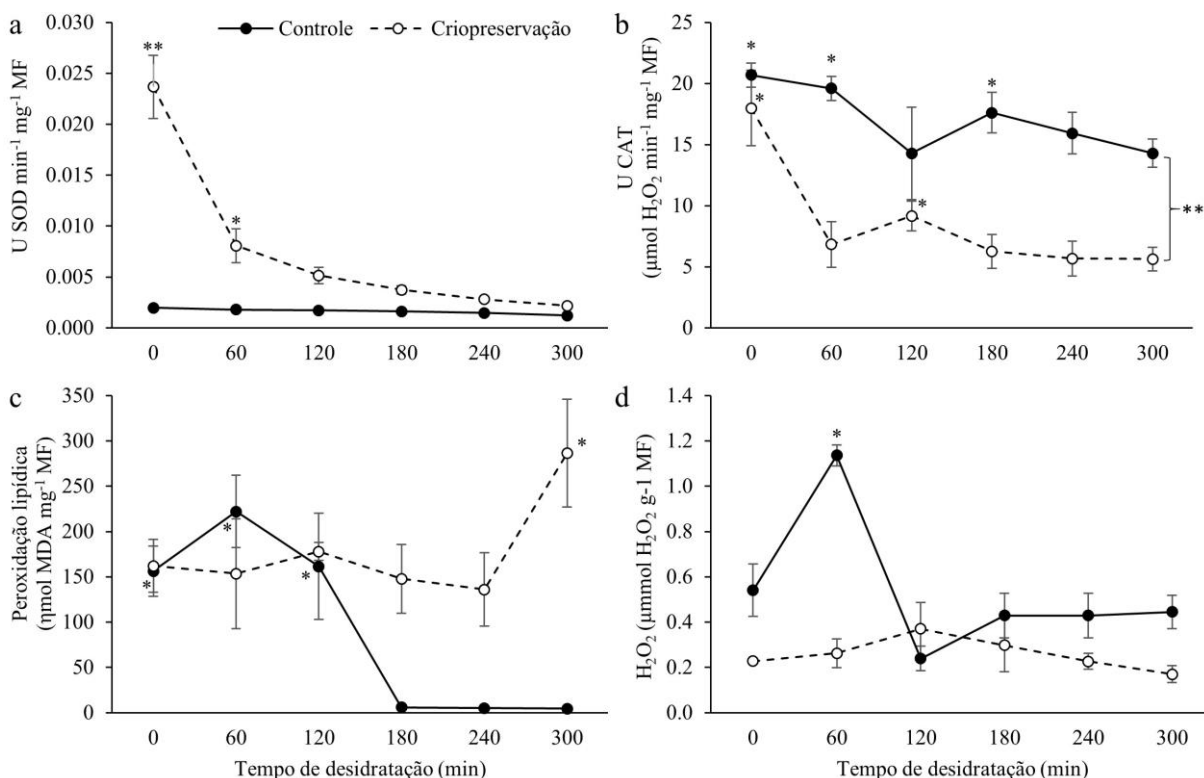
3.2.3 Análises bioquímicas de sementes

A criopreservação causou redução na atividade da SOD ao longo do tempo de desidratação. Contudo, a atividade enzimática se manteve constante na semente não criopreservada (Figura 6a). A atividade da CAT no grupo controle e nas sementes criopreservadas diminuiu ao longo do tempo, havendo também uma notável menor atividade nas sementes criopreservadas em relação ao controle (Figura 6b).

Os níveis de H_2O_2 no controle atingiram um pico máximo aos 60 minutos de desidratação, mantendo-se estáveis a partir de 120 minutos (Figura 6d). Por outro lado, as sementes que passaram pela criopreservação apresentaram aproximadamente os mesmos níveis de H_2O_2 independentemente do tempo de desidratação (Figura 6d).

A peroxidação lipídica do controle foi maior nos tratamentos que foram desidratados por até 120 minutos, sendo que a partir de 180 minutos os valores caíram para próximos de zero (Figura 6c). Por sua vez, as sementes criopreservadas mantiveram o mesmo nível de peroxidação lipídica até 240 minutos de desidratação, passando a ter um aumento significativo aos 300 minutos (Figura 6c).

Figura 6 - Atividade específica da SOD, CAT, Peroxidação lipídica e quantificação de H_2O_2 ao longo dos tempos de desidratação.



Legenda: *Indica diferença significativa em relação aos demais tratamentos não marcados na mesma série. **Indica diferença significativa em relação a cada tratamento no mesmo tempo de desidratação.

Mecanismos de defesa enzimáticos, não enzimáticos e proteínas são desenvolvidos pelas plantas devido às condições de estresse (osmótico e desidratação), às quais os explantes são submetidos durante a criopreservação (KACZMARCZYK et al., 2012). Esses mecanismos são capazes de diminuir ou neutralizar os danos que as EROs podem causar nas proteínas, lipídeos e DNA (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011). Porém, ao superar o nível dos mecanismos de defesa das células, as EROS produzidas em maior quantidade conseguem se espalhar nas células vegetais e afetar processos celulares, levando à morte celular (GOMES; GARCIA, 2013)

A superóxido dismutase (SOD) constitui a primeira linha de defesa contra as EROs e é a principal enzima do sistema antioxidante, dismutando os íons superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Na pesquisa, observou-se que a criopreservação resultou em uma alta atividade específica inicial da SOD que diminuiu conforme o tempo de desidratação. Contudo, a atividade enzimática manteve-se constante no controle (Figura 6a).

A remoção do superóxido é considerada mais importante que a formação de H_2O_2 , pois o superóxido é uma das espécies mais reativas e causadora de danos nas células. Ainda assim, a CAT, que está presente em todos os compartimentos celulares, decompõe o H_2O_2 , mitigando os seus efeitos nocivos. Na pesquisa, a atividade da CAT no grupo controle e nas sementes criopreservadas diminuiu ao longo do tempo, assim como teve uma notável menor atividade nas sementes criopreservadas em relação ao controle (Figura 6b).

Os níveis de H_2O_2 no controle atingiram um pico máximo aos 60 minutos de desidratação, mantendo-se estáveis a partir de 120 minutos (Figura 6c). Por outro lado, as sementes que passaram pela criopreservação apresentaram aproximadamente os mesmos níveis de H_2O_2 independentemente do tempo de desidratação (Figura 6c).

A atividade das enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) promovem proteção contra os danos oxidativos, como comprovado na criopreservação de sementes de *Azadirachta indica* que conseguiram uma alta germinação (VARGHESE; CHANDRA, 2008). Na *C. rufa*, provavelmente, as atividades das enzimas não conseguiram eliminar a maior parte das EROs.

As membranas celulares são uma das áreas que mais são danificadas na criopreservação, levando à desnaturação de proteínas e decomposição de ácidos nucleicos (WEN et al., 2010). Na membrana celular, os ácidos lipídicos poli-insaturados são os primeiros em serem atacados por EROS específicas como: radical hidroxila, peroxil e oxigênio singlete. O malondialdeído (MDA) e o 4 – hidroxilnoneal (HNE) são os principais produtos tóxicos da peroxidação lipídica (MENON et al., 2014; JIA et al., 2017).

A acumulação de MDA é considerada um indicador de estresse oxidativo durante a criopreservação. A correlação negativa com a percentagem de sobrevivência dos explantes na criopreservação é um importante fator para a avaliação dos resultados (PRUDENTE; PAIVA, 2017).

A peroxidação lipídica do controle foi maior nos tratamentos que foram desidratados por até 120 minutos, sendo que a partir de 180 minutos os valores caíram para próximos de zero (Figura 6d). Por sua vez, as sementes criopreservadas mantiveram o mesmo nível de peroxidação lipídica até 240 minutos de desidratação, passando a ter um aumento significativo aos 300 minutos (Figura 6d).

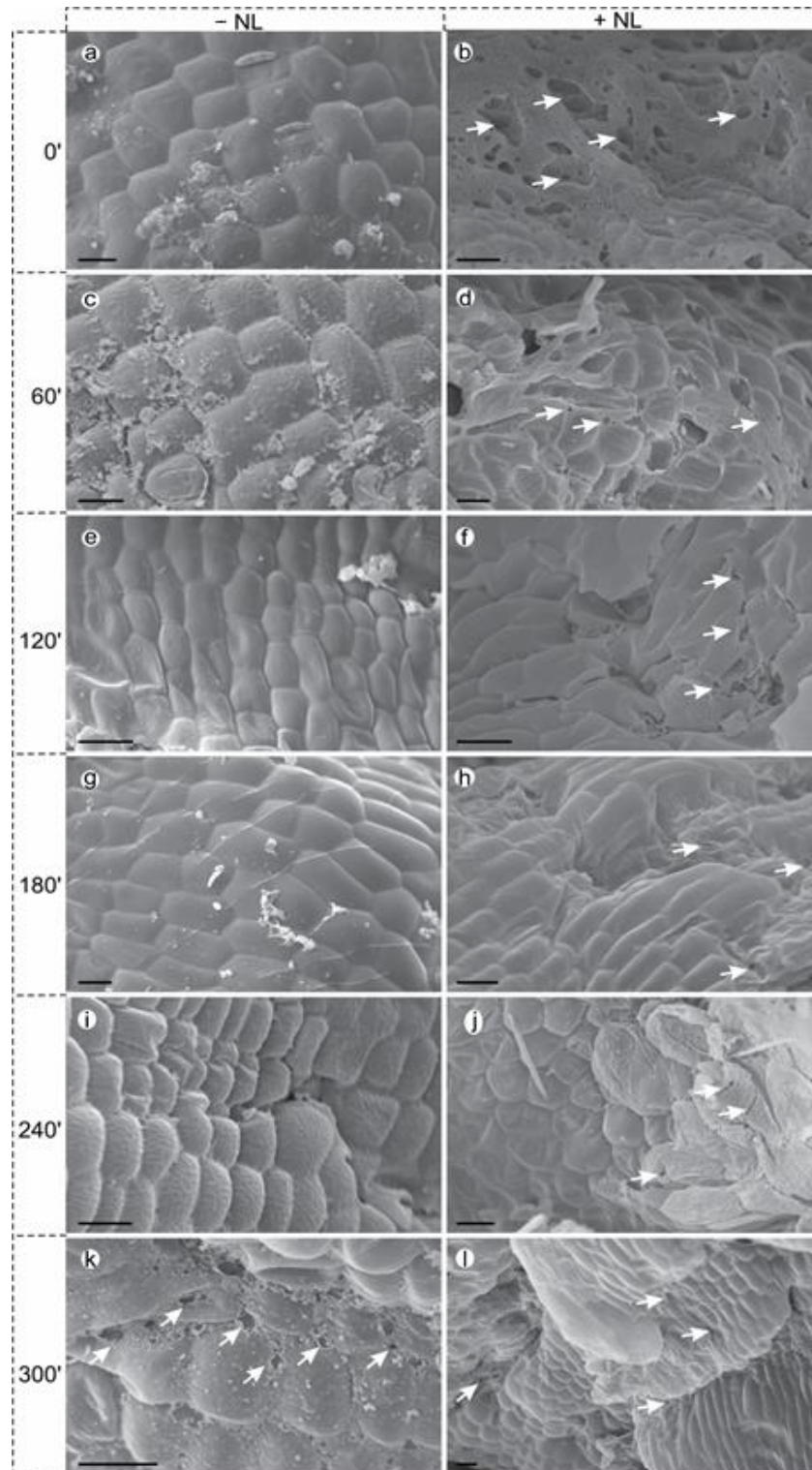
A geração estável das EROs e o incremento de MDA causou a diminuição na sobrevivência após a criopreservação em suspensão celular de arroz, embriões somáticos de

azeitona e gemas apicais de linho e amora (BENSON; LYNCH; JONES, 1992; OBERT et al., 2005; UCHENDU et al., 2010; LYNCH et al., 2011). Também, observou-se em *Arabidopsis thaliana* que o incremento de radical hidroxila associada à peroxidação lipídica causou taxas baixas de sobrevivência em embriões somáticos criopreservados e mudas (CHEN et al., 2015).

3.2.4 Análise ultraestrutural

Ao observar a micrografia de sementes de *C. rufa* do tratamento controle, percebe-se que até 240 minutos de desidratação não foram observadas lesões celulares graves nas células do embrião (Figura 7a, c, e, g, i). Aos 300 minutos, numerosas pequenas aberturas, indicadas pelas setas, foram visíveis (Figura 7k). Observou-se ainda no controle que as células apresentam um aspecto de estriamento nas paredes aos 240 minutos de desidratação (Figura 7i). Em sementes criopreservadas, em todos os tempos de desidratação, observou-se estruturas celulares desuniformes e perda da turgidez das paredes (Figura 7b, d, f, h, j, l).

Figura 7. Micrografia de semente de *C. rufa* após tempos de desidratação e criopreservação.



Legenda: Aumento de flacidez celular nos tratamentos desidratados que não foram criopreservados (a, c, e, g, i) e lesões críticas indicadas pelas setas aos 300 minutos (k); múltiplas de lesões (setas) nas células dos tratamentos criopreservados em cada tempo de desidratação (b, d, f, h, j, l); +NL= Sementes submersas em Nitrogênio Líquido; -NL= Sementes não submersas em Nitrogênio Líquido. Barras: 10 μ m.

As etapas da desidratação e criopreservação causam estresse nos explantes (BRUŇÁKOVÁ; ČELLÁROVÁ, 2016). Os efeitos de desidratação, assim como o teor de umidade nos tecidos a serem criopreservados, são relevantes em função da saída abrupta de água das células poder lesionar estruturas importantes como proteínas, organelas e membranas (GUIMARÃES et al., 2018).

No caso das sementes de *C. rufa*, observou-se lesões nos embriões (Figura 7). Semelhantemente, danos ultraestruturais foram visíveis nas sementes de *Genipa americana*, com 10,2% de umidade, observando-se compactação no conteúdo de reserva interna e aumento no espaço intracelular do endosperma (MAGISTRALI et al., 2013).

Adicionalmente, relatou-se danos nas folhas de plântulas provenientes de sementes criopreservadas. Assim, observou-se nas espécies do mesmo gênero como *Hypericum annulatum*, *H. tomentosum*, *H. rumeliacum*, *H. humifusum*, *H. kalmianum* e *H. perforatum*, danos no mesófilo. A espécie de *H. perforatum* foi a única que apresentou danos nos cloroplastos (STOYANOVA-KOLEVA et al., 2015).

Danos fisiológicos foram relatados nas sementes de *C. pubescens* e *E. pyriformis* por dessecação, a partir de 30% de umidade, classificando-as como recalcitrantes (DOUSSEAU et al., 2011; SCALON et al., 2012). Alterações anatômicas e morfológicas têm sido reportadas e estudadas amplamente, mas ainda não são bem conhecidas nas sementes, sobretudo no gênero *Campomanesia*.

Assim, estudos ultraestruturais são úteis para entender diferentes respostas à desidratação e criopreservação de sementes recalcitrantes e ortodoxas, através de estudos no funcionamento celular (GUIMARÃES et al., 2018).

3.3 Droplet vitrification de ápices caulinares

Observou-se que os ápices caulinares não sobreviveram à criopreservação em nenhuma das combinações de pré-tratamento, crioprotetor e tempo de exposição ao crioprotetor. Contudo, observou-se que o pré-tratamento com sacarose e a crioproteção com PVS2 por 30 minutos foi menos tóxica para os explantes, resultando em maior sobrevivência (Tabela 1). Por outro lado, o pré-tratamento com manitol mostrou-se mais tóxico para a espécie estudada, resultando em uma sobrevivência menor dos explantes não criopreservados.

Tabela 1 - Sobrevivência de ápices caulinares após criopreservação em diferentes tempos de exposição a crioprotetores e diferentes pré-tratamentos com açúcares.

Pré-tratamento	Crioprotetor	Tempo (min)	Tratamento	Sobrevivência (%)
Sacarose	PVS2	15	-NL	40.00 ± 13.09b
		30		60.00 ± 13.09a
		60		20.00 ± 10.69c
		15	+NL	0.00 ± 0.00d
		30		0.00 ± 0.00d
		60		0.00 ± 0.00d
	PVS2+PG	15	-NL	33.33 ± 12.60b
		30		20.00 ± 10.69c
		60		13.33 ± 9.09c
		15	+NL	0.00 ± 0.00d
		30		0.00 ± 0.00d
		60		0.00 ± 0.00d
Manitol	PVS2	15	-NL	6.67 ± 6.67d
		30		13.33 ± 9.09c
		60		13.33 ± 9.09c
		15	+NL	0.00 ± 0.00d
		30		0.00 ± 0.00d
		60		0.00 ± 0.00d
	PVS2+PG	15	-NL	20.00 ± 10.69c
		30		0.00 ± 0.00d
		60		0.00 ± 0.00d
		15	+NL	0.00 ± 0.00d
		30		0.00 ± 0.00d
		60		0.00 ± 0.00d

Legendas: PVS2 = *Plant Vitrification Solution 2*; PG = floroglucinol; +NL= Sementes submersas em Nitrogênio Líquido; -NL= Sementes não submersas em Nitrogênio Líquido; *Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste Skott-Knott.

O uso de explantes caulinares na criopreservação foi outra alternativa, pois possuem alta capacidade morfogênética, são células geneticamente estáveis e livres de vírus; sendo um explante ideal para se criopreservar (REED et al., 2011). Dentre as técnicas de criopreservação, a *droplet vitrification* vem apresentando resultados promissores para ápices caulinares (KULUS; ZALEWSKA, 2014).

Espécies foram criopreservadas com sucesso utilizando a técnica mediante o uso de ápices de *Hancornia speciosa* (mangaba) (SANTOS et al., 2015), *Byrsonima intermedia*

(SILVA et al., 2013), *Carica papaya* (KAITY et al., 2008), de meristemas apicais de *Lilium*, *Chrysanthemum morifolium*, batata, petúnia (WANG et al., 2013; WANG et al., 2014; YIN et al., 2014; ZHANG et al., 2015) e *Passiflora suberosa* L. (GARCIA et al., 2011). Não se reportam estudos com sucesso no gênero *Campomanesia*.

Na pesquisa, a percentagem da sobrevivência dos explantes nos tempos de PVS2 e PVS2 mais floroglucinol foi nula. Por outro lado, o controle com 30 minutos submersos no crioprotetor PVS2 e com pré-tratamento de sacarose obteve 60% de sobrevivência, apresentando a maior percentagem de sobrevivência dentre os tratamentos (Tabela 1).

Por sua vez, nos pré-tratamentos com manitol (0,5 M) as percentagens de sobrevivência dos ápices não criopreservados foram baixas comparadas às da sacarose (0,5 M). A percentagem mais alta atingida foi de 20% no controle submerso por 15 minutos no crioprotetor PVS2 adicionado de floroglucinol (Tabela 1).

No entanto, na *E. dysenterica*, o melhor tratamento para ápices não criopreservados constituiu-se de 0,25 M de sacarose combinado a 1 hora de desidratação, com 55,55% de regeneração. A taxa de regeneração nula de ápices criopreservados indica provável ruptura no sistema de membranas causada pela desidratação e congelamento das cápsulas (SILVEIRA; SIBOV, 2019).

Considerou-se o uso de açúcares nos pré-tratamentos por seu papel fundamental como osmoprotetor. O uso de sacarose, segundo estudos proteômicos, influenciou na expressão dos genes responsáveis pela glicólise, pela integridade da parede celular e no envolvimento de proteínas em vias celulares de resposta ao estresse por frio, permitindo a sobrevivência à desidratação em banana e batata (CARPENTIER et al., 2005; FOLGADO et al., 2014).

Na criopreservação se utiliza o crioprotetor PVS2 (30% glicerol, 15% etileno glicol e 15% DMSO) por ser uma solução altamente concentrada que aumenta a viscosidade intracelular. Átomos de hidrogênio, de uma molécula de água, são atraídos para grupos hidroxila do etileno glicol ou do glicerol, causando a estabilização de membranas fosfolipídicas (WILLHITE; KATZ, 1984; ROBERTSON et al., 1988; TOWEY; SOPER; DOUGAN, 2013).

O DMSO causa o afrouxamento das membranas devido a interações eletrostáticas entre a fração de sulfóxido polar do DMSO e os resíduos de fosfatidilserina nas membranas fosfolipídicas, permitindo a saída rápida da água e a entrada de outros crioprotetores (YU; QUINN, 1994). O excesso de DMSO pode inibir a respiração mitocondrial e aumentar o

cálcio citosólico, amplificando o sinal apoptótico e desorganizando as membranas (GALVAO et al., 2014).

Por outro lado, o uso de DMSO (15%) dentro da solução de PVS2 apresentou resultados positivos nas culturas de *Malus*, *Solanum*, *Lonicera* e *Berberis* (ROMADANOVA, 2017). A capacidade regenerativa dos brotos após a criopreservação apresentou uma média de 50%. Após o armazenamento em nitrogênio líquido, as brotações sobreviveram e se desenvolveram rapidamente (ROMADANOVA, 2017).

No caso de *Passiflora ligularis*, o aumento do tempo de exposição ao PVS2 com 15% de DMSO favoreceu a germinação de embriões (PRUDENTE et al., 2019). Sementes de *Sinningia leucotricha*, planta nativa do Brasil, apresentaram maior percentagem de germinação (57%) sem a necessidade de crioprotetores como PVS2 ou floroglucinol (39%) (STEGANI et al., 2017). Porém, na *C. rufa* não apresentou resultados positivos (Tabela 1).

O uso de floroglucinol foi considerado na pesquisa uma vez que seus derivados são metabólitos secundários que ocorrem amplamente nas Myrtaceae. A aplicação de floroglucinol em ápices de *Hypericum spp.* melhorou a sobrevivência e a recuperação dos ápices criopreservados. Provavelmente, devido a presença da hiperforina e adiperforina, derivados do floroglucinol (BRUŇÁKOVÁ et al., 2011).

Cada etapa dos processos da criopreservação precisa ser manipulada adequadamente para ter resultados positivos. Apesar da existência de protocolos padrões, ainda faltam implementar melhorias inerentes a cada espécie (NORMAH; SULONG; REED, 2019). Ainda não são conhecidos os fatores principais e o nexa entre a resposta das plantas às manipulações da criopreservação (GUIMARÃES et al., 2018).

4 CONCLUSÕES

Conseguiu-se otimizar protocolos de germinação *in vitro* da espécie *C. rufa* por meio do corte distal no tegumento em meio MS com 100% da concentração de sais, 30 g L⁻¹ de sacarose e 0 a 40 mg/L de nanotubos de carbono. Além disso, sementes sem corte distal da submetidas aos protocolos de criopreservação foram adequadas, mesmo que a taxa de germinação natural da espécie seja baixa.

REFERÊNCIAS

- AGATHOKLEOUS, E. et al. The two faces of nanomaterials: A quantification of hormesis in algae and plants. **Environment International**, v. 131, p. 1–10, 2019.
- ANTUNES, A. et al. Morfometria de sementes, germinação *in vitro* e propagação vegetativa de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seed morphometry, *in vitro* germination and vegetative propagation in sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 13, n. 3, p. 1–7, 2018.
- AQUILA, M. E. A.; FERREIRA, A. G. Germinação de sementes escarificadas de *Araucaria angustifolia* em solo. **Campinas: Ciência e Cultura**, v. 36, n. 9, p. 1583–1590, 1984.
- BADOU, R. B.; YEDOMONHAN, H. Dehydration capacity and germination of the generative seeds of *Syzygium guineense* subsp. macrocarpum (Myrtaceae) in Benin. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, v. 4, n. 10, p. 95–104, 2017.
- BARBEDO, C. J. A new approach towards the so-called recalcitrant seeds. **Journal of Seed Science**, v. 40, n. 3, p. 221–236, 2018.
- BATISTA, T. B.; DUARTE, E.; BINOTTI, C. Priming of *Bracharia* seeds with different sugar sources and concentrations. **Revista Caatinga**, v. 31, n. 4, p. 843–849, 2018.
- BEGUM, P.; IKHTIARI, R.; FUGETSU, B. Potential impact of multi-walled carbon nanotubes exposure to the seedling stage of selected plant species. **Nanomaterials**, v. 4, p. 203–221, 2014.
- BENSON, E. E.; LYNCH, P. T.; JONES, J. The detection of lipid peroxidation products in cryoprotected and frozen rice cells: Consequences for post-thaw survival. **Plant Science**, v. 85, n. 1, p. 107–114, 1992.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, v. 116, n. 2, p. 651–658, 1998.
- BRUŇÁKOVÁ, K. et al. Dehydration status of ABA-treated and cold-acclimated *Hypericum perforatum* L. shoot tips subjected to cryopreservation. **Thermochimica Acta**, v. 525, n. 1–2, p. 62–70, 2011.
- BRUŇÁKOVÁ, K.; ČELLÁROVÁ, E. Conservation strategies in the genus *Hypericum* via cryogenic treatment. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 558, p. 1–12, 2016.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. In: ELSEVIER (Ed.). **Methods in Enzymology**. vol. 52 ed. [s.l.] Academic Press, 1978. p. 302–310.

- CAMPOS, N. A. et al. Tipo de explante e constituição da cápsula na produção e armazenamento de unidades encapsuláveis de gabioba (*Campomanesia pubescens*). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 10, n. 1, p. 13–19, 2014.
- CARPENTIER, S. C. et al. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, v. 5, n. 10, p. 2497–2507, 2005.
- CARVALHO, J. T. de G. de et al. Medicinal plants from Brazilian Cerrado: Antioxidant and anticancer potential and protection against chemotherapy toxicity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–16, 2019.
- CEJAS, I. et al. Exposure of common bean seeds to liquid nitrogen modifies mineral composition of young plantlet leaves. **American Journal of Plant Sciences**, v. 7, n. 12, p. 1612–1617, 2016.
- CHEN, G. Q. et al. Cryopreservation affects ROS-induced oxidative stress and antioxidant response in *Arabidopsis* seedlings. **Cryobiology**, v. 70, n. 1, p. 38–47, 2015.
- DOĞAROĞLU, Z. G.; KÖLELİ, N. Effect of titanium dioxide and titanium dioxide-silver nanoparticles on seed germination of lettuce (*Lactuca sativa*). **Çukurova Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi**, v. 31, n. 2, p. 193–198, 2016.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 47, n. 1, p. 5–16, 2011.
- FAHY, G. M.; WOWK, B. Principles of cryopreservation by vitrification. In: WOLKERS, W. F.; OLDENHOF, H. (Ed.). **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Methods in Molecular Biology**. New York: Springer, 2015. 1257p. 21–82.
- FERNANDES, R. M. et al. Seed germination and seedling formation of *Eugenia stictopetala* (Myrtaceae) under different environmental conditions. **Floresta**, v. 49, n. 4, p. 869–876, 2019.
- FERREIRA, E.; CAVALCANTI, P.; NOGUEIRA, D. ExpDes.pt: Experimental Designs package. R package (Português) version 1. 2013.
- FOLGADO, R. et al. Changes in sugar content and proteome of potato in response to cold and dehydration stress and their implications for cryopreservation. **Journal of Proteomics**, v. 98, p. 99–111, 2014.
- FREITAS, D. A. et al. Levantamento de dados de espécies florestais nativas do Cerrado: Um meio para bancos de sementes implantados que permitem restauração e conservação de ecossistemas. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 2, n. 5, p. 1569–1583, 2019.
- GALVAO, J. et al. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. **The FASEB Journal**, v. 28, n. 3, p. 1317–1330, 2014.

GARCIA, R. O. et al. *In vitro* conservation of *Passiflora suberosa* L.: Slow growth and cryopreservation. **Cryo-Letters**, v. 32, n. 5, p. 377–388, 2011.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309–314, 1977.

GOELZER, A. et al. Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). **Brazilian Applied Science Review**, v. 3, n. 2, p. 1280–1291, 2019.

GOMES, M. P.; GARCIA, Q. S. Reactive oxygen species and seed germination. **Biologia**, v. 68, n. 3, p. 351–357, 2013.

GUIMARÃES, C. C. et al. Ultrastructural changes and integrity of genomic DNA in germinated seeds of *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert subjected to drying. **Revista Árvore**, v. 41, n. 4, p. 1–10, 2018.

HODGES, D. M. et al. Antioxidant enzyme responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 5, p. 1105–1113, 1997.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behaviour**. (No 1). Bioversity International, 1996.

HUSSAIN, M. et al. *In vitro* seed germination and biochemical profiling of *Artemisia absinthium* exposed to various metallic nanoparticles. **3 Biotech**, v. 7, n. 2, p. 1–8, 2017.

IKENGANYIA, E. et al. Plant tissue culture regeneration and aseptic techniques. **Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology**, v. 1, n. 3, p. 1–6, 2017.

IQBAL, M.; BAKHT, J. Phytosynthesis of silver nanoparticles from *Arisaema jacquemontii* extract, their characterization and antimicrobial potential. **Pakistan Journal of Botany**, v. 51, n. 5, p. 1853–1857, 2019.

IUCN – International Union for Conservation of Nature. **The IUCN red list of threatened species**. Version 2020-1. Available in: <www.iucnredlist.org>. Access in: March, 14, 2020.

JIA, M. X. et al. ROS-induced oxidative stress is closely related to pollen deterioration following cryopreservation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 53, p. 433–439, 2017.

KACZMARCZYK, A. et al. 2012. Current issues in plant cryopreservation. In: **Current Frontiers in Cryobiology**. p. 418–437.

KAITY, A. et al. Assessment of genetic and epigenetic changes following cryopreservation in papaya. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 9, p. 1529–1539, 2008.

- KIM, D. H.; GOPAL, J.; SIVANESAN, I. Nanomaterials in plant tissue culture: The disclosed and undisclosed. **RSC Advances**, v. 7, n. 58, p. 36492–36505, 2017.
- KULUS, D.; ZALEWSKA, M. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species - A review. **Scientia Horticulturae**, v. 168, p. 88–107, 2014.
- LEÃO-ARAÚJO, É. et al. Embebição e emissão da raiz primária de sementes de *Campomanesia adamantium* em função da temperatura. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 2, p. 111–120, 2019a.
- LEÃO-ARAÚJO, É. F. et al. O vigor e a viabilidade explicam a maturidade fisiológica de sementes sensíveis a desidratação de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg? **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 3, p. 684–690, 2019b.
- LYNCH, P. T. et al. Effects of osmotic pretreatments on oxidative stress, antioxidant profiles and cryopreservation of olive somatic embryos. **Plant Science**, v. 181, n. 1, p. 47–56, 2011.
- MAGISTRALI, P. R. et al. Physiological behavior of *Genipa americana* L. seeds regarding the capacity for desiccation and storage tolerance. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 4, p. 495–500, 2013.
- MARTINOTTO, C. et al. Efeito da escarificação e luminosidade na germinação *in vitro* de sementes de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1668–1671, 2007.
- MATSUMOTO, T.; SAKAI, A.; YAMADA, K. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabi japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. **Plant Cell Reports**, v. 13, n. 8, p. 442–446, 1994.
- MAYRINCK, R. C.; VAZ, T. A. A.; DAVIDE, A. C. Classificação fisiológica de sementes florestais quanto à tolerância à dessecação e ao comportamento no armazenamento. **Cerne**, v. 22, n. 1, p. 85–92, 2016.
- MENON, A. et al. Cold-induced changes affect survival after exposure to vitrification solution during cryopreservation in the south-west Australian Mediterranean climate species *Lomandra sonderi* (Asparagaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 119, n. 2, p. 347–358, 2014.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Regras para Análise de Sementes (RAS). Divisão de sementes e mudas**. Brasília, DF. s.n. 2009. 399p. vol. 2.
- MITTAL, G. et al. A review on carbon nanotubes and graphene as fillers in reinforced polymer nanocomposites. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 21, p. 11–25, 2015.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 474–497, 1962.

- NORMAH, M. N.; SULONG, N.; REED, B. M. Cryopreservation of shoot tips of recalcitrant and tropical species: Advances and strategies. **Cryobiology**, v. 87, p. 1–14, 2019.
- OBERT, B. et al. Moderation of morphogenetic and oxidative stress responses in flax *in vitro* cultures by hydroxynonenal and desferrioxamine. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, n. 5, p. 537–547, 2005.
- PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of criopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In: RUANE, J.; SONNINO, A. (Ed.). **The Role of Biotechnology in Exploring and Protecting Agricultural Genetic Resources**. FAO. Rome: Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO), 2006. p. 61–78.
- PAVEI, F. et al. Effects of glutathione supplementation and carbon source during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae). **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 40, p. 1–8, 2018.
- PINHAL, H. F. et al. Concentration of MS medium and cutting of seeds on *in vitro* establishment of baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.). **Bioscience Journal**, v. 33, n. 2, p. 306–313, 2017.
- PRITCHARD, H. W. et al. Cryobiotechnology of tropical seeds – scale, scope and hope. **Acta Horticulturae**, v. 1167, p. 37–48, 2017.
- PRUDENTE, D. d. O. et al. The cryoprotectant PVS2 plays a crucial role in germinating *Passiflora ligularis* embryos after cryopreservation by influencing the mobilization of lipids and the antioxidant metabolism. **Journal of Plant Physiology**, v. 239, p. 71–82, 2019.
- PRUDENTE, D. D. O. et al. Germinação *in vitro* e criopreservação de sementes de *Zinnia elegans*. **Ornamental Horticulture**, v. 21, n. 2, p. 243, 2015.
- PRUDENTE, D. O. et al. Germinação *in vitro* e criopreservação de sementes de Paineira-Rosa. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 15, n. 3, p. 272–276, 2016.
- PRUDENTE, D. O.; PAIVA, R. Plant cryopreservation : Biochemical aspects. **Journal Cell Developmental Biology**, v. 1, n. 1:2, p. 1–3, 2017.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2019.
- REED, B. M. et al. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 47, n. 1, p. 1–4, 2011.
- ROBERTSON, S. M. et al. Toxicity of the cryoprotectants glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol, sucrose, and sea salt solutions to the embryos of red drum. **The Progressive Fish Culturist**, v. 50, p. 37–41, 1988.

- ROMADANOVA, N. Development of a common PVS2 vitrification method for cryopreservation of several fruit and vegetable crops. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 53, p. 382–393, 2017.
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 30–33, 1990.
- SANT'ANA, C. et al. *In vitro* propagation of *Campomanesia rufa*: An endangered fruit species. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n. 4, p. 372–380, 2018.
- SANTOS, M. da S. et al. Caracterização química e avaliação do potencial antioxidante do doce em massa de gabioba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg). **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 35, n. 1, p. 73–82, 2013.
- SANTOS, M. L. S.; SANTOS, C. H. G. Cultivo *in vitro* de sementes de camu-camu sob diferentes meios e concentrações de sacarose. **Revista Multidisciplinar Pey Këyo**, v. 5, n. 1, p. 27–38, 2019.
- SANTOS, P. A. A. et al. Criopreservação de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes): Um protocolo para armazenamento a longo prazo. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 37, n. 3, p. 289–296, 2015.
- SILVA, L. C. et al. Shoot-tip cryopreservation by droplet vitrification of *Byrsonima intermedia* A. Juss.: A woody tropical and medicinal plant species from Brazilian Cerrado. **Cryo-Letters**, v. 34, n. 4, p. 338–348, 2013.
- SILVEIRA, A. A. da C.; SIBOV, S. T. Encapsulamento-desidratação de ápices caulinares de *Eugenia dysenterica*. **Multi-Science Journal**, v. 2, n. 2, p. 39–41, 2019.
- SOUZA, F. V. D. et al. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 124, n. 2, p. 351–360, 2016.
- STEGANI, V. et al. Criopreservação de sementes de rainha do abismo (*Sinningia leucotricha*). **Ornamental Horticulture**, v. 23, n. 1, p. 15–21, 2017.
- STOYANOVA-KOLEVA, D. et al. Structural modifications in the mesophyll associated with cryopreservation of seven *Hypericum* species. **Biologia Plantarum**, v. 59, n. 3, p. 514–520, 2015.
- STRECZYNSKI, R. et al. Current issues in plant cryopreservation and importance for *ex situ* conservation of threatened Australian native species. **Australian Journal of Botany**, v. 67, n. 22, p. 1–15, 2019.
- TIMOTEO, C. d. et al. Silver nanoparticles in the micropropagation of *Campomanesia rufa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 137, n. 2, p. 359–368, 2019.

TIWARI, D. K. et al. Interfacing carbon nanotubes (CNT) with plants: Enhancement of growth, water and ionic nutrient uptake in maize (*Zea mays*) and implications for nanoagriculture. **Applied Nanoscience**, v. 4, p. 577–591, 2014.

TOWEY, J. J.; SOPER, A. K.; DOUGAN, L. What happens to the structure of water in cryoprotectant solutions? **Faraday Discussions**, v. 167, p. 159–176, 2013.

UCHENDU, E. E. et al. Vitamins C and E improve regrowth and reduce lipid peroxidation of blackberry shoot tips following cryopreservation. **Plant Cell Reports**, v. 29, n. 1, p. 25–35, 2010.

VARGHESE, B.; CHANDRA, S. Oxidative metabolism-related changes in cryogenically stored neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 755–765, 2008.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, v. 151, n. 1, p. 59–66, 2000.

VENDRAME, W. A.; FARIA, R. T. Phloroglucinol enhances recovery and survival of cryopreserved *Dendrobium nobile* protocorms. **Scientia Horticulturae**, v. 128, n. 2, p. 131–135, 2011.

WANG, B. et al. Development of three vitrification-based cryopreservation procedures for shoot tips of China's potato. **Cryo-Letters**, v. 34, n. 4, p. 369–380, 2013.

WANG, R. R. et al. Shoot recovery and genetic integrity of *Chrysanthemum morifolium* shoot tips following cryopreservation by droplet-vitrification. **Scientia Horticulturae**, v. 176, p. 330–3390, 2014.

WILLHITE, C. C.; KATZ, P. I. Toxicology updates. Dimethyl sulfoxide. **Journal of applied toxicology : JAT**, v. 4, n. 3, p. 155–60, 1984.

YIN, Z. F. et al. An efficient, widely applicable cryopreservation of *Lilium* shoot tips by droplet vitrification. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 7, p. 1683–1692, 2014.

YOUSEFI, S.; KARTOOLINEJAD, D.; NAGHDI, R. Effects of priming with multi-walled carbon nanotubes on seed physiological characteristics of Hopbush (*Dodonaea viscosa* L.) under drought stress. **International Journal of Environmental Studies**, v. 74, n. 4, p. 528–539, 2017.

YU, Z. W.; QUINN, P. J. Dimethyl sulphoxide: A review of its applications in cell biology. **Bioscience Reports**, v. 14, n. 6, p. 259–281, 1994.

ZHANG, J. M. et al. Identification of a highly successful cryopreservation method (droplet-vitrification) for petunia. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 51, n. 4, p. 445–451, 2015.

ZUNINGA, A. et al. Capacidade antioxidantes de frutos nativos do Cerrado (*Hancornia speciosa*, *Campomanesia xanthocarpa*, *Eugenia dysenterica*) uma breve revisão. **Desafios**, v. 5, n. 1, p. 128–134, 2018.

CAPITULO 2: Isolamento, identificação molecular e controle *in vitro* de bactérias endógenas de *Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied.

RESUMO

Campomanesia rufa (O. Berg) Nied. (Myrtaceae) é uma espécie nativa do Cerrado. A conservação *in vitro* é uma alternativa para espécies em perigo de extinção como a *C. rufa*. Porém, a falta de protocolos eficazes para a desinfestação de microrganismos endofíticos presentes naturalmente na planta dificulta o sucesso da micropropagação. Dentro deste contexto, objetivou-se a identificação molecular e controle *in vitro* da contaminação por meio de antibióticos. O sequenciamento da bactéria se realizou mediante o método de Sanger, a partir de produtos purificados da PCR dos isolados bacterianos. Comparou-se com sequências homólogas usando o programa BLAST ('Basic Local Alignment Search Tool'). As sequências obtidas neste estudo e as sequências homólogas obtidas no GenBank foram alinhadas mediante o programa MEGA7 para as reconstruções de árvores filogenéticas. A avaliação da sobrevivência, a altura das brotações e eficiência dos antibióticos (estreptomicina, ampicilina e cloranfenicol) a diferentes concentrações (0, 32, 64, 128, 256 mg L⁻¹) no meio de cultura, realizou-se aos 25 dias. Evidenciou-se a ocorrência de *Bacillus* sp. e de diferentes 'strains' na planta. No controle do *Bacillus* sp. com antibióticos, a ampicilina a 32 mg L⁻¹ causou uma redução significativa da contaminação bacteriana sem, no entanto, afetar a sobrevivência dos explantes. Por outro lado, a estreptomicina ocasionou uma maior redução da contaminação a 256 mg L⁻¹, porém foi letal a mais de 90% dos explantes nesta concentração. Deste modo, o trabalho contribui ao fazer o primeiro relato sobre a ocorrência de bactérias endógenas e o controle visando a conservação da espécie nativa.

Palavras-chaves: Sequenciamento. Árvore filogenética. Antibióticos.

ABSTRACT

Campomanesia rufa (O. Berg) Nied. (Myrtaceae) is a species native to the Cerrado. *In vitro* conservation is an alternative for endangered species such as *C. rufa*. However, the lack of protocols used for the disinfection of endogenous microorganisms occurring naturally in the plant hinders the success of micropropagation. In this context, we aimed to molecularly identify endogenous bacteria in *C. rufa*. The bacterial sequencing was carried out using the Sanger method, using purified products from the PCR of the bacterial isolates. It was compared with homologous sequences utilized the BLAST program ('Basic Local Alignment Search Tool'). The sequences selected in this study and the homologous sequences recorded in GenBank were aligned using the MEGA7 program for reconstructions of phylogenetic trees. The assessments of the survival, the height of shoots, and the efficiency of antibiotics (streptomycin, ampicillin, and chloramphenicol) at different concentrations (0, 32, 64, 128, 256 mg L⁻¹) were carried out after 25 days. It was pointed out the occurrence of *Bacillus* sp. and different strains in the plant. In the control of *Bacillus* sp. with antibiotics, ampicillin at 32 mg L⁻¹ caused a significant reduction in bacterial contamination without, however, affecting the survival of explants. On the other hand, streptomycin caused a greater reduction in contamination at 256 mg L⁻¹, but it was lethal to more than 90% of explants in this concentration. In this way, the work is the first report on the occurrence of endogenous bacteria and the control aiming at the conservation of the native species.

Keywords: Sequencing. Phylogenetic tree. Antibiotics.

1 INTRODUÇÃO

O bioma Cerrado é considerado uma das savanas com maior biodiversidade do mundo (OLIVEIRA et al., 2019). Diferentes espécies vegetais nativas do Cerrado produzem frutos com potencial nutricional e farmacêutico, portanto podem ser utilizadas para a obtenção de compostos secundários, como fenóis, antioxidantes e agentes antiproliferativos de células cancerígenas humanas (CARVALHO et al., 2019).

As escassas informações sobre o uso e as propriedades das espécies vegetais nativas do Cerrado são os reflexos da falta de estudos científicos sobre estas espécies em compreender as suas interações (SILVA et al., 2019). Soma-se ao cenário a devastação de quase 50% do bioma, que levou a perda da diversidade genética de um número inestimável de espécies nativas (COHN et al., 2019), principalmente da família Myrtaceae (SILVA et al., 2019).

Características econômicas importantes de espécies nativas possibilitam que programas de melhoramento genético aproveitem tais qualidades mais rapidamente (BELO et al., 2019). O gênero *Campomanesia* da família Myrtaceae, por exemplo, apresenta um alto teor de vitamina C e compostos fenólicos (SILVA et al., 2019). Além disso, estudos revelaram interações benéficas entre microrganismos (endofíticos) e plantas, que também podem ser benéficas para a agricultura (TAHIR et al., 2017).

Uma das espécies que merece atenção por estar na categoria “em perigo” de extinção pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN, 2020) é a *Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied., conhecida como casaqueira ou gabioba (SANT’ANA et al., 2018). Essa Myrtaceae frutífera lenhosa é endêmica do Cerrado Mineiro (VILLARROEL et al., 2016).

Uma alternativa para a reprodução e repovoamento de plantas nativas em perigo de extinção é a cultura de tecidos, uma vez que a técnica possibilita uma alta taxa de multiplicação (OSENI; VEENA; KUMAR NAILWAL, 2018) e, se necessário, a manutenção das características genéticas da espécie por meio da micropropagação.

A multiplicação *in vitro*, que seria uma solução para reprodução vegetal de forma rápida, ainda é difícil em muitas espécies nativas do Cerrado como *C. rufa*. Algumas das razões para as dificuldades técnicas incluem o baixo índice de germinação das sementes (SANT’ANA et al., 2018) e a falta de protocolos eficazes para a desinfestação de microrganismos epifíticos e endofíticos presentes naturalmente nas plantas. Quando a

contaminação é endógena, o número de protocolos de assepsia é limitante (ALI et al., 2018), ainda mais quando se trata de espécies lenhosas (SALLES et al., 2017).

A relação planta-microrganismo endofítico pode produzir metabólitos secundários e enzimas com potencial para uso biotecnológico nas indústrias alimentícia, farmacêutica, medicinal e têxtil (GOPINATH et al., 2017; ORLIKOWSKA; NOWAK; REED, 2017; SAVI; ALUIZIO; GLIENKE, 2019). Além disso, a interação planta-microrganismo endofítico pode gerar novos metabólitos para o benefício de ambas as espécies (ORLIKOWSKA; NOWAK; REED, 2017). O conhecimento da interação planta-microrganismo endofítico contribui para o entendimento da ecologia da planta e fornece subsídios para estudos de melhoramento e manejo de doenças em plantas nativas com potencial econômico.

No entanto, na maior parte dos casos, a contaminação por microrganismos no meio de cultura é um problema para a propagação ou manutenção de culturas *in vitro* (MAHMOUD; AL-ANI, 2016; METWALY; SALAMA; ALI, 2018). Por outro lado, estudos específicos relacionados aos endofíticos relatam algum benefício quando a planta é cultivada *in vitro* (SANTOYO et al., 2016). Entretanto, mesmo estes microrganismos devem ser cuidadosamente controlados, pois competem pelos nutrientes disponíveis no meio (SHEHATA et al., 2016).

Por esses e outros motivos, deseja-se que a desinfestação realizada por meio da imersão dos explantes em etanol 70% e, subsequentemente, em solução com outra substância desinfetante como o hipoclorito de sódio, elimine qualquer microrganismo contaminante sobre a superfície (HUANG; YUAN; CHEN, 2020). Quando não for o suficiente, pode-se lançar mão da suplementação dos meios com antibióticos (KHAN et al., 2018).

Dentre os antibióticos conhecidos, ampicilina, estreptomicina e cloranfenicol são amplamente conhecidos e utilizados na cultura de tecidos (TORRES; HOULLOU; DE SOUZA, 2016; BUCKSETH et al., 2017; GERSZBERG; GRZEGORCZYK-KAROLAK, 2019). A ampicilina é uma aminopenicilina de amplo espectro que atua inibindo a biossíntese de mucopeptídeos de parede celular (TEIXEIRA DA SILVA et al., 2003). Por sua vez, estreptomicina e cloranfenicol são inibidores da síntese proteica (PANKHURST, 1977).

Portanto, este trabalho teve por objetivos o isolamento e a identificação molecular da bactéria endógena de plântulas *in vitro* de *C. rufa*, detectada durante a execução dos protocolos de multiplicação *in vitro*; assim como, avaliar a concentração ideal dos antibióticos

ampicilina, estreptomicina e cloranfenicol para o controle da bactéria endógena em brotações de *C. rufa in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolamento e identificação das bactérias endógenas

2.1.1 Identificação da planta

A planta da espécie *Campomanesia rufa* utilizada neste estudo estava localizada a 21°13'35.5" latitude sul e 44°59'00.7" longitude oeste. Exemplares da planta são mantidos no Herbário ESAL, localizados no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, sob o número do registro: ESAL21198.

2.1.2 Germinação e multiplicação *in vitro*

Frutos maduros de *C. rufa* foram coletados e lavados com água corrente e detergente, antes da extração das sementes. As sementes foram estabelecidas *in vitro* de acordo com protocolo de Sant'Ana et al. (2018).

As sementes inoculadas foram mantidas no escuro durante 7 dias e depois transferidas para sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas, sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de 25 ± 2 °C. As sementes foram mantidas nessa condição por 4 a 6 meses para obtenção de brotos.

O meio de multiplicação utilizado para a inoculação dos brotos foi composto por sais do meio MS suplementados com 0,09 M de sacarose, 2,5 g L⁻¹ de Phytigel®, 5,6 μM de Benzilaminopurina (BAP), o pH aferido para pH 5,8 antes da inclusão do Phytigel®, e autoclavado a 121 °C e 1,5 atm por 20 minutos. Os explantes foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de 25 ± 2 °C (SANT'ANA et al., 2018).

Entretanto, durante o desenvolvimento dos protocolos para multiplicação *in vitro* foi observada a presença de brotos com sintomas de podridão, semelhante àqueles induzidos por bactéria.

Os procedimentos para a detecção do microrganismo causador da podridão de plântulas e sua identificação foram realizados no Laboratório de Diagnóstico Fitopatológico do Instituto Biológico, em São Paulo (SP).

2.1.3 Isolamento da bactéria presente em *Campomanesia rufa*

A bactéria foi isolada a partir de brotos de *C. rufa* multiplicados *in vitro*. Para isso, exsudados bacterianos e fragmentos de plântulas de gabioba foram estriados em placas de Petri contendo 25 a 30 mL de meio Nutrient Agar (Kasvi, Madrid, Espanha). O meio foi preparado previamente de acordo com as instruções do fabricante. As placas de Petri foram vedadas e incubadas a 25 °C por 24 a 48 horas para formação das colônias.

Para manutenção das colônias foram realizadas repicagens a cada 20-30 dias no meio Nutrient Agar.

2.1.4 Coloração de Gram

A coloração de Gram foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Cerny (1976).

2.1.5 Extração de DNA genômico da bactéria

Uma vez que houve a formação de colônias bacterianas, tanto a partir do exsudado quanto a partir dos fragmentos de plântulas, foi possível realizar a extração do DNA bacteriano a partir dessas colônias.

O DNA bacteriano foi extraído mediante dois protocolos. Em um dos protocolos foi utilizado o *Kit Wizard® Plus Miniprep-DNA purification system*, de acordo com as instruções do fabricante (Promega, Estados Unidos). No outro, foi utilizado o *DNAzol® Reagent - Genomic DNA isolation reagent* (Thermo Fisher, Estados Unidos), conforme descrito pelo fabricante.

2.1.6 Amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Para a detecção de bactéria, e posterior sequenciamento do *amplicon*, foi utilizado como alvo o gene que codifica para a subunidade 16S ribossomal (16S rRNA), o qual, de acordo com Kai et al. (2019), é estratégico para o diagnóstico da presença de bactérias.

Os DNAs bacterianos obtidos pelos dois procedimentos de extração foram submetidos à PCR com *primers* dirigidos para o gene 16S rDNA. Os *primers* utilizados na PCR foram aqueles descritos por Young et al. (1991), para o *primer* senso Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGCGGC-3') e Cruz et al. (2001), para o *primer* reverso Y3 (5'-CTGACCCCACTTCAGCTTGTTCAT-3').

As PCRs foram realizadas com 3 µL de DNA, 1 µL de cada *primer* a 10 µM, 0,5 µL de dNTP (10 mM), 2,5 µL de 10x PCR Buffer (GeneDireX, Taoyuan, Taiwan), 0,25 µL de Taq DNA Polimerase (GeneDireX, Taoyuan, Taiwan) e água ultrapura para completar o volume de 25 µL de reação. As reações foram submetidas à desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguida por 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 74 °C por 2 minutos, e uma extensão final a 74 °C por 10 minutos, em um termociclador Axygen.

O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1x (TRIS - ácido acético - EDTA), em presença de brometo de etídio. A corrida eletroforética foi realizada a 80 V por 40 minutos. O registro das imagens foi feito no sistema de documentação de gel com câmera integrada a um transiluminador UDV-312 Series Major Science.

2.1.7 Purificação do produto da PCR e sequenciamento

Os produtos obtidos da PCR de três isolados bacterianos foram recortados do gel de agarose e purificados com o *Kit Wizard PCR Preps DNA purification system* (Promega, Estados Unidos), de acordo com fabricante.

Os produtos purificados foram enviados para sequenciamento no Laboratório de Vírus de Bovídeos do Instituto Biológico (São Paulo), utilizando o método de Sanger.

2.1.8 Análise das sequências e filogenia

As sequências obtidas foram comparadas com sequências homólogas usando o programa BLAST (*'Basic Local Alignment Search Tool'*), disponível na página do *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) – www.ncbi.nlm.nih.gov.

As sequências obtidas neste estudo e as sequências homólogas obtidas no GenBank foram alinhadas com o auxílio do programa MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) e ajustadas manualmente. O alinhamento foi utilizado para a análise *'pairwise'* e para as reconstruções de árvores filogenéticas, ambos utilizando o programa MEGA7.

2.2 Antibióticos para o controle *in vitro* de bactérias endógenas de *Campomanesia rufa*

2.2.1 Uso de antibióticos em meio de cultura

Brotos com duas gemas axilares, obtidos de material sob multiplicação *in vitro* conforme descrito nos itens 2.1.1, 2.1.2 e 2.1.3, foram cultivados em meio de multiplicação fresco. Ao meio de multiplicação, foram adicionados, individualmente, os antibióticos ampicilina, cloranfenicol e estreptomicina. As concentrações utilizadas para cada antibiótico foram 32, 64, 128, 256 mg L⁻¹. O controle consistiu de meio de cultura sem os antibióticos.

Previamente, os antibióticos foram esterilizados a frio por filtração (Millipore, 0,22 µm) e adicionados ao meio de cultura quando este estava em processo de resfriamento (40 a 50 °C).

Cada tratamento se consistiu de 30 repetições. Avaliou-se, aos 25 dias, a percentagem de explantes com sintomas de podridão bacteriana, a percentagem de sobrevivência dos explantes e a altura das brotações.

O material *in vitro* foi mantido em sala de crescimento com fotoperíodo 16h e temperatura 25±2 °C.

2.2.2 Análises Estatísticas

Os experimentos foram em delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram analisadas a 5%

de probabilidade ou por regressão ou pelo teste de Scott-Knott quando a regressão não foi significativa. As análises estatísticas foram realizadas no software estatístico R versão 3.5.2 (R CORE TEAM, 2019) utilizando o pacote ExpDes.pt (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2013).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferentes microrganismos podem viver endogenamente nas plantas e, na sua relação com a hospedeira, causar um impacto neutro, negativo ou positivo (RIBEIRO; PAMPHILE, 2017). O estudo da diversidade de microrganismos endofíticos em espécies de plantas nativas pouco exploradas, como é o caso de *C. rufa*, pode levar à descoberta de microrganismos de interesse para as áreas médica e agrícola (CONTESINI; MELO; SATO, 2018).

3.1 Colônias de bactéria em meio de propagação

Nos explantes *in vitro* de *C. rufa*, a presença de bactérias endógenas foi visível após os subcultivos tanto a partir da propagação de brotos de plantas adultas quanto de sementes. Na natureza não havia sintomas de podridão na planta. Apesar do protocolo de desinfestação, a bactéria permaneceu nas sementes, e posteriormente nas plântulas germinadas, se multiplicando no meio de cultura MS com pH 5,8. No início, observou-se que a presença da bactéria não foi prejudicial e permitiu o crescimento da plântula (Figura 1).

Figura 1 – Sintoma de podridão, de origem bacteriana, em plântulas *in vitro* de *Campomanesia rufa* (Barra = 1 cm).



Fonte: Da autora (2020).

Essa mesma condição ocorreu com a espécie *Anthurium andraeanum* Lind., na qual a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *Dieffenbachiae* se manteve latente de quatro meses a um ano, sem causar sintomas e nem turbidez no meio de cultura MS (MCCULLOCH; PIRONE, 1939).

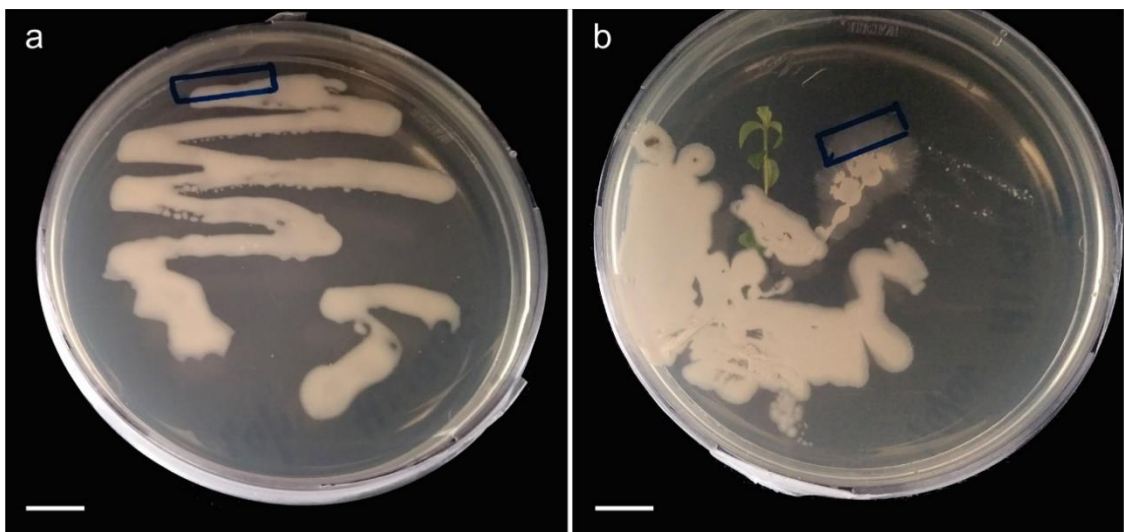
3.2 Características das colônias bacterianas

Os ‘*strains*’ bacterianos que se multiplicaram no meio de cultura MS com pH 5,8 durante a micropropagação da planta foram isolados a partir de exsudados e fragmentos de plântulas de *C. rufa*. As colônias bacterianas obtidas apresentaram aspecto leitoso brilhante e com dois tipos de contorno: um regular e liso e outro irregular. Além dessa condição, em uma das placas, a colônia obtida a partir de exsudatos da planta apresentou apenas contorno regular e liso. Repicagens de cada uma dessas colônias, ou seja, colônias de bordos lisos e colônias de contornos irregulares, deram origem ao que foram denominados ‘*strains*’ bacterianos 5SF e

5CF, respectivamente. O isolado bacteriano a partir de colônia apenas com o contorno regular e liso foi denominado ‘strain 5’ (Figura 2).

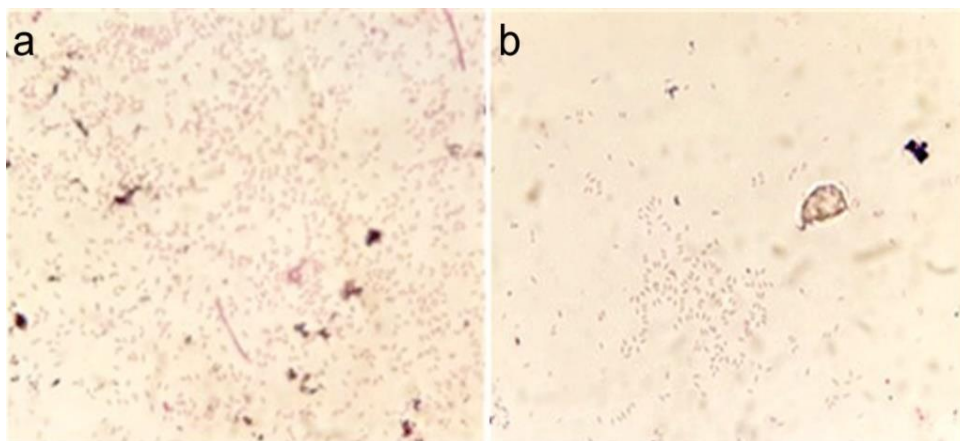
Os testes de Gram realizado com os ‘*strains*’ bacterianos indicaram se tratar de bactérias Gram positivas (Figura 3).

Figura 2 - Bordas de colônias de bactérias isoladas de brotos *in vitro* de *C. rufa*.
Legenda: a. Bordas lisas; b. Bordas onduladas (Barra = 1 cm).



Fonte: Da autora (2020).

Figura 3 - Esfregaço bacteriano mostrando coloração indicativa de bactérias Gram positivas.



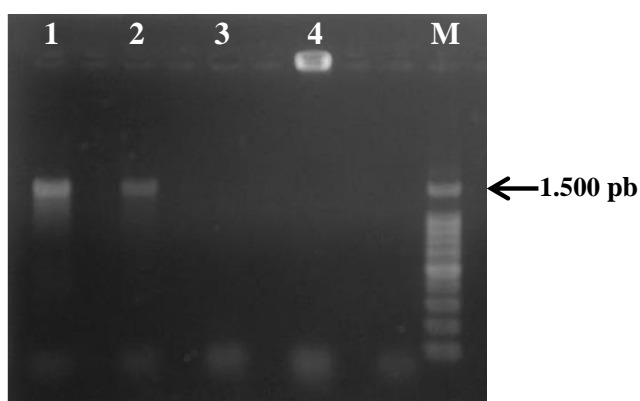
Legenda: a. ‘Strain’ 5 SF; b. ‘Strain’ 5 CF. Aumento de 120x.
Fonte: Da autora (2020).

3.3 Análise do DNA bacteriano e PCR

Para o estabelecimento do protocolo de extração de DNA bacteriano, as colônias de bordas lisas e bordas franjadas foram misturadas e processadas em dois métodos.

Os métodos utilizados para a extração de DNA bacteriano se mostraram eficientes, uma vez que as PCRs realizadas com os DNAs obtidos a partir dos dois procedimentos resultaram em um produto de aproximadamente 1500 pb (Figura 4), como esperado para o par de *primers* Y1/Y3.

Figura 4 - Análise, em gel de agarose, de produtos obtidos em PCR para 16S rRNA com DNA extraído por dois métodos.



Legenda: 1. Extração de DNAs com DNAzol. 2. Extração de DNAs com *Kit Wizard® Plus Miniprep-DNA purification system*. 3. Controle negativo (apenas reagentes). 4. Bactérias trituradas em água ultrapura. M - marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, Norgen).

Fonte: Da autora (2020).

A partir desse resultado, os DNAs das colônias dos ‘*strains*’ 5, 5 SF e 5 CF foram extraídos com DNAzol. Os métodos de extração de DNA normalmente variam de acordo com a amostra ou matriz (NASCIMENTO et al., 2017). Porém, as soluções devem conter uma substância tampão para estabilizar o pH, um sal para dissociar as proteínas, um detergente para solubilizar as membranas e um agente inativante das DNases, cuja função é proteger o DNA genômico (NASCIMENTO et al., 2017).

3.4 Análise das sequências e filogenia

O gene 16S rRNA, por ser altamente conservado, é utilizado na reconstrução de relações filogenéticas de microrganismos (CRUZ et al., 2001; ALI et al., 2018).

A análise de ‘*pairwise*’ entre as três sequências correspondentes ao gene 16S rRNA, obtidas a partir das bactérias isoladas de *C. rufa*, e aquelas obtidas no GenBank está apresentada na Tabela 1.

Colônias com diferentes contornos, ‘*strains*’ 5 CF e 5 SF, apresentaram 90,5% de identidade entre suas sequências, enquanto que colônias de contornos lisos e regulares de diferentes placas de Petri, ‘*strains*’ 5 SF e 5, apresentaram 96,8% entre elas. As maiores percentagens de identidade entre os três ‘*strains*’ bacterianos obtidos de *C. rufa* e aqueles depositados no GenBank foram 97,3% para o ‘*strain*’ 5SF, 98,9% para o ‘*strain*’ 5 e 98,7% para o ‘*strain*’ 5CF (Tabela 1).

O ‘*strain*’ 5SF teve altas percentagens de identidade não só com ‘*strains*’ de *Bacillus thuringiensis*, como também com *B. cereus* e *Bacillus* sp. Altas percentagens de identidade do ‘*strain*’ 5 foram obtidas com *strains* de *B. thuringiensis*, *Bacillus* sp. e *Bacterium*. Por sua vez, o ‘*strain*’ 5CF apresentou percentagens de identidade mais significativas com os ‘*strains*’ de *B. altitudini*, *B. pumilus*, *Bacillus* sp. e *Bacterium* (Tabela 1).

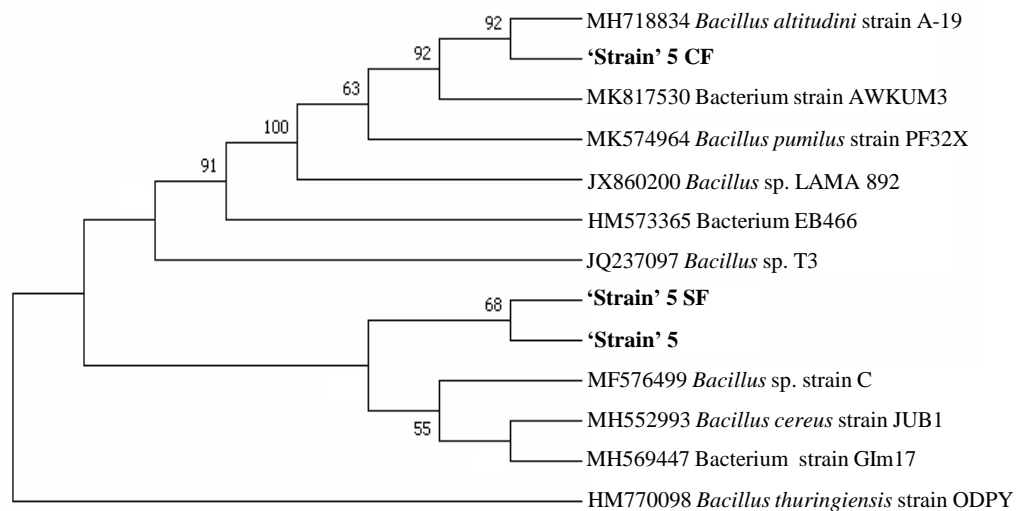
A árvore filogenética reconstruída a partir o alinhamento das sequências os genes 16S rRNA está representada na Figura 5. Nessa árvore pode ser observado que os três ‘*strains*’ bacterianos isolados de *C. rufa* não permaneceram na mesma subárvore. O ‘*strain*’ 5 CF, colônia bacteriana com contorno irregular, compartilha o mesmo ancestral de *B. altitudini*, enquanto os ‘*strains*’ obtidos de colônias com bordos lisos e regulares, 5 e 5SF, compartilham o mesmo ancestral.

Tabela 1 - Percentagem de identidade, em nucleotídeos, entre os genes 16S rRNA de ‘strains’ bacterianos isolados de *C. rufa* e aqueles depositados no GenBank.

Sequências/ Números de Acesso no GenBank	Strains											
	EB466	5 SF	ODPY	T3	JUB1	GIm17	5	A-19	PF32X	LAMA 893	AWKUM3	5 CF
‘Strain’ 5SF	97,3											
HM770098 <i>Bacillus thuringiensis</i> strain ODPY	100	97,3										
JQ237097 <i>Bacillus</i> sp. T3	100	97,3	100									
MH552993 <i>Bacillus cereus</i> strain JUB1	99,7	97,2	99,7	99,7								
MH569447 Bacterium strain GIm17	99,9	97,2	99,9	99,9	99,8							
‘Strain’ 5	98,9	96,8	98,9	98,9	98,6	98,8						
MH718834 <i>Bacillus altitudini</i> strain A-19	94,5	91,3	94,5	94,5	94,3	94,5	93,2					
MK574964 <i>Bacillus pumilus</i> strain PF32X	94,5	91,3	94,5	94,5	94,3	94,5	93,2	100				
JX860200 <i>Bacillus</i> sp. LAMA 892	94,6	91,4	94,6	94,6	94,3	94,5	93,3	99,9	99,9			
MK817530 Bacterium strain AWKUM3	94,5	91,3	94,5	94,5	94,3	94,5	93,2	100	100	99,9		
‘Strain’ 5CF	93,0	90,5	93,0	93,0	92,8	93,0	92,7	98,7	98,7	98,6	98,7	
MF576499 <i>Bacillus</i> sp. strain C	99,9	97,2	99,9	99,9	99,8	100	98,8	94,5	94,5	94,5	94,5	93,0

Legenda: EB466- Sequência do gene 16S rRNA de *Bacterium* EB466, acesso número HM573365.

Figura 5. Árvore filogenética inferida pelo método de *Maximum Likelihood*, baseada no modelo Kimura 2 parâmetros, para as sequências de nucleotídeos do gene 16S rRNA. Um total de 1135 posições foram analisadas, sendo excluídas as posições com ‘gaps’. *Bootstrap* de 1000 replicatas, tendo as percentagens de árvores nas quais as taxas foram agrupadas mostradas próximas aos ramos. Valores inferiores a 50% de *bootstrap* não estão mostrados na árvore. A análise filogenética foi realizada com o programa MEGA7.



De acordo com os resultados obtidos nas análises de ‘pairwise’ e filogenética, os três ‘strains’ bacterianos foram considerados como pertencentes ao gênero *Bacillus* sp., não sendo possível identificar a espécie (Tabela 1; Figura 5).

As espécies do gênero *Bacillus* podem ser anaeróbicas, aeróbicas ou facultativas (VILLARREAL-DELGADO et al., 2018). As bactérias são Gram-positivas, possuem morfologia de bastonetes e formam esporos em condições adversas, permitindo uma longa sobrevivência em diferentes habitats, com uma faixa ampla de pH (2 a 10) (SHAFI; TIAN; JI, 2017). Essas bactérias produzem também esporos termorresistentes uma vez que possuem genes de choque térmico induzíveis (CALVO, 2010).

Embora seu habitat possa ser o solo, bactérias do gênero *Bacillus* podem ser isoladas de diversos hospedeiros, de vegetais a seres humanos (VILLARREAL-DELGADO et al., 2018), podendo ser tanto fitopatógenos quanto oportunistas e produtoras de toxinas (ELSHAGHABEE et al., 2017). Além disso, apresentam grande diversidade de mecanismos de ação para contribuir com a sanidade de plantas (LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010). Como exemplos, podem ser mencionados o uso das espécies como *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. cereus* e *B. subtilis* para promover o melhor desenvolvimento de mudas de *Chrysophyllum cainito* L. e de *Litchi chinensis* Sonn (SANTOS et al., 2018), e o uso de

Bacillus Rh219 para aumentar os parâmetros biométricos e a atividade de enzimas de defesa em plantas de arroz (YASMIN et al., 2016).

Em condições de campo, algumas bactérias endógenas possuem a capacidade de favorecer a produção de hormônios vegetais, o crescimento de plantas, a solubilização do fosfato, a fixação do nitrogênio, a criação de resistência a patógenos e a degradação de metais pesados (LIU et al., 2017). No entanto, em cultura de tecidos, as bactérias endógenas podem ser prejudiciais pela competição por nutrientes com a planta (CHEONG; NA; JEONG, 2019).

Um fato interessante observado nas análises filogenéticas foi a inferência de se ter ‘*strains*’ com diferentes ancestrais coexistindo dentro de uma mesma planta de *C. rufa*, visto que dois isolados com a mesma característica de colônias, 5 SF e 5, compartilham o mesmo ancestral, que por sua vez é diferente daquele de 5 SF. Assim, estudos que visem o entendimento da relação não só bactéria endógena-planta hospedeira, mas também entre ‘*strains*’ bacterianos coexistindo na mesma planta, são estratégicos para o uso adequado dessas bactérias para fins de controle biológico.

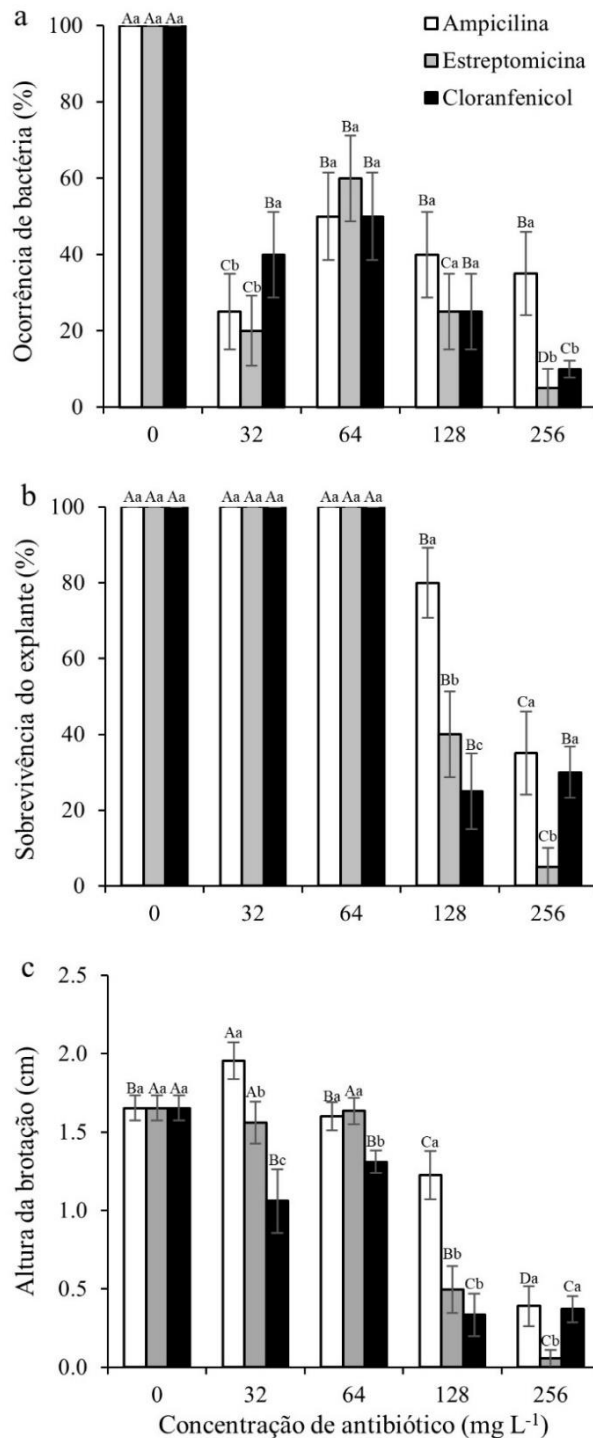
Apesar do alto potencial econômico de espécies do Cerrado como *C. rufa*, não existem registros sobre a microbiota associada à espécie. Portanto, o conhecimento de outros microrganismos e a sua relação com as espécies nativas permitiriam o desenvolvimento de pesquisas voltadas a recursos genéticos ou produtos derivados para fins agrônômicos, industriais, farmacêuticos, cosméticos e alimentares (COSTESSI et al., 2018).

3.5 Antibióticos para o controle *in vitro* de bactérias endógenas em brotos de *Campomanesia rufa*

O experimento realizado mostrou que os antibióticos ampicilina, estreptomicina e cloranfenicol reduziram a ocorrência da contaminação bacteriana em *C. rufa*, sem, no entanto, comprometerem a sobrevivência do material vegetal até a concentração de 64 mg L⁻¹ (Figura 6-7). Estes resultados são importantes, pois apontam para a eliminação da infestação microbiana e contribuem para a assepsia e manutenção da cultura estabelecida *in vitro*.

De fato, observou-se que mesmo o efeito da menor concentração dos antibióticos causou uma redução para níveis abaixo de 30% na ocorrência de bactéria no caso de ampicilina e estreptomicina, e para níveis abaixo de 40% com cloranfenicol. Entretanto, em nenhuma concentração testada houve completa eliminação bacteriana (Figuras 6a; 7).

Figura 6 - Efeito da concentração dos antibióticos sobre o percentual de ocorrência de bactéria.



Legenda: (a); sobrevivência do explante (b); e altura da brotação (c). Barras: erro padrão. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si ao longo das concentrações, conforme teste Skott-Knott ao nível de 5%. Letras minúsculas iguais não diferem entre si em uma mesma concentração, conforme teste Skott-Knott ao nível de 5%.

Assim sendo, a combinação de mais de um antibiótico seria uma alternativa viável, pensando na assepsia completa do material vegetal (ORLIKOWSKA; NOWAK; REED, 2017). Para tanto, pode-se lançar mão de duas estratégias básicas: adição conjunta (mistura) ou sequencial (ciclos sucessivos) de antibióticos (QUAMBUSCH; WINKELMANN, 2018).

De modo específico, a ampicilina apresenta atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo, portanto, um antibiótico de amplo espectro (ESLAMI; SARLAK, 2018). Por sua vez, a estreptomicina é indicada contra infecções causadas por bactérias Gram-negativas ou Gram-positivas se associada a outros antibióticos (RAMIREZ; TOLMASKY, 2017; TERTIGAS; BARBER, 2019). Do mesmo modo, o cloranfenicol se apresenta como um antibiótico de amplo espectro (ANSILIERO; CANDIAGO; GELINSKI, 2018).

Do ponto de vista toxicológico, é interessante que o agente desinfetante atue apenas sobre os organismos patogênicos, deixando a espécie vegetal em sua plena vitalidade (QUAMBUSCH; WINKELMANN, 2018). Tal fato se observou até a concentração de 64 mg L⁻¹ nos três antibióticos avaliados. Todavia, a partir da concentração de 128 mg L⁻¹ a sobrevivência dos explantes foi reduzida (Figuras 6b; 7). Não obstante, estreptomicina e cloranfenicol causaram as maiores percentagens de perda de explantes (Figura 7).

Embora os efeitos dos antibióticos residuais nas plantas em relação a saúde humana sejam bem estudados, pouca atenção tem sido dada aos seus efeitos em plantas, especialmente naquelas não cultivadas (MINDEN et al., 2017). Porém, é amplamente difundido que altas concentrações de antibióticos podem ser tóxicas às plantas e inibir o crescimento, a fotossíntese e causar estresse oxidativo (BAO; GU; ZHANG, 2016; MINDEN et al., 2017; RIAZ et al., 2017; LIU et al., 2018).

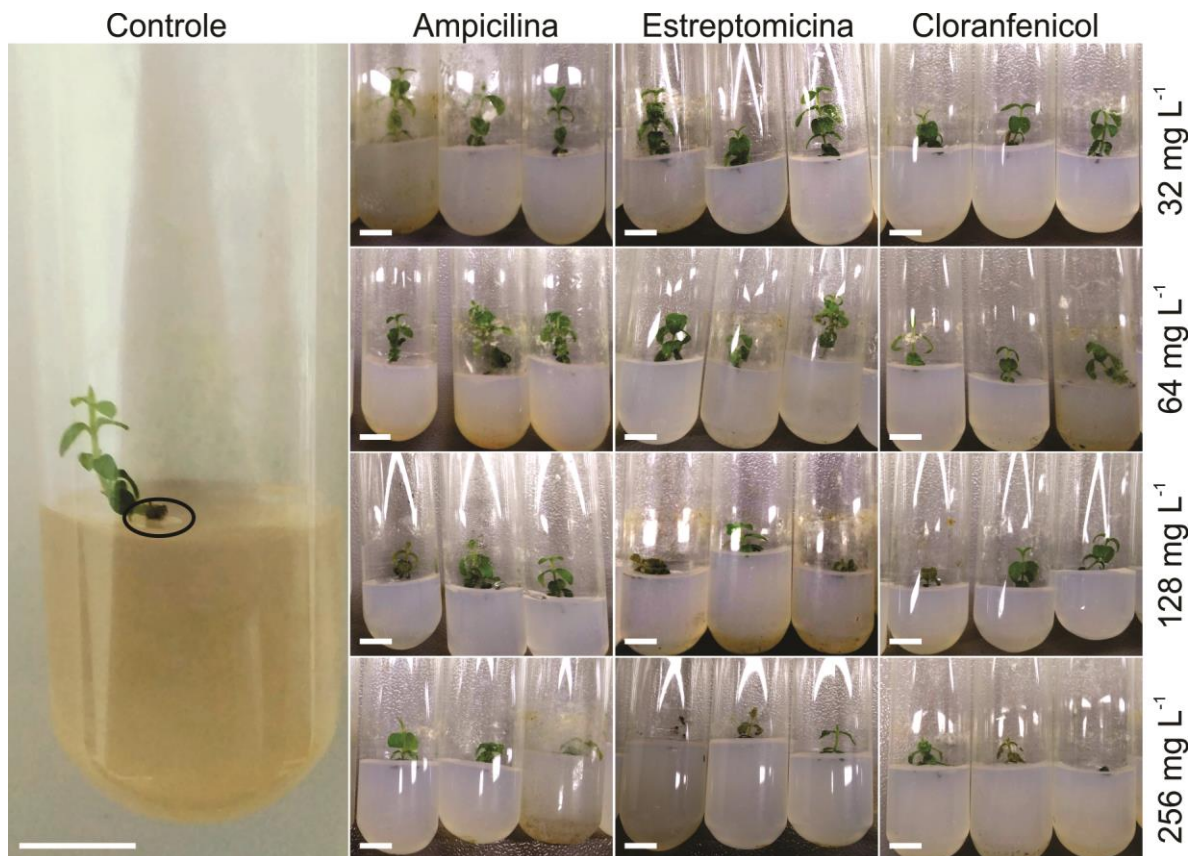
Seguindo a mesma lógica, observou-se ainda que estreptomicina e cloranfenicol afetaram negativamente o crescimento das brotações regeneradas a 128 mg L⁻¹. Por sua vez, a ampicilina a 32 mg L⁻¹ causou um leve estímulo ao crescimento, resultando em brotos mais altos que no controle, ao passo que a partir de concentrações mais elevadas houve efeito inibitório (Figuras 6c; 7).

Os antibióticos possuem um efeito bifásico no crescimento caracterizado pela hormese, onde uma baixa dose tem efeito estimulatório ou benéfico, e uma alta dose tem efeito inibitório ou tóxico (PAN; CHU, 2017). Além disso, sabe-se que a fitotoxicidade varia conforme o antibiótico e a espécie vegetal (PAN; CHU, 2017). Nesse sentido, a concentração limiar de sobrevivência sob a exposição a diferentes antibióticos em tabaco (*Nicotiana tabacum* Samsun SS) e duas cultivares de crisântemo (*Dendranthema x grandiflora*) foi

nitidamente diferente (TEIXEIRA DA SILVA et al., 2003). Ainda que no mesmo estudo a classificação de toxicidade entre os antibióticos tenha sido mantida: cloranfenicol > estreptomicina > ampicilina.

Portanto, haja vista que a contaminação não foi completamente eliminada e considerando-se a variedade de microrganismos que pode estar se proliferando no meio de cultura, seria interessante a utilização em menor concentração de mais de um antibiótico individualmente em subcultivos, a fim de possivelmente se obter uma cultura livre de contaminação.

Figura 7 – Brotos de *Campomanesia rufa* inoculados *in vitro* submetidos a diferentes concentrações de antibióticos.



Legenda: Circunferência destaca a presença da bactéria.

Fonte: Da autora (2020).

4 CONCLUSÕES

Trata-se do primeiro relato da ocorrência de bactérias endógenas (*Bacillus* sp.) em brotos de *Campomanesia rufa*, e da presença de diferentes ‘*strains*’ coexistindo na planta. A podridão mole em plantas de *C. rufa* não pode ser definitivamente associada à presença de um, dois ou três ‘*strains*’ de *Bacillus* sp.

Quanto ao controle do *Bacillus* sp. com antibióticos, ficou evidente que a ampicilina (32 mg L⁻¹) causou uma redução significativa da contaminação bacteriana sem, no entanto, afetar a sobrevivência dos explantes, além de promover o crescimento da planta. Por outro lado, a estreptomicina (256 mg L⁻¹) ocasionou uma maior redução da contaminação, porém foi letal a mais de 90% dos explantes nesta concentração.

REFERÊNCIAS

- ALI, M. et al. Endogenous bacterial contamination of plant tissue culture materials: Identification and control strategy. **Plant Tissue Culture & Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 99–108, 2018.
- ANSILIERO, R.; CANDIAGO, N. T.; GELINSKI, J. M. L. N. Caracterização bioquímica e potencial de biocontrole de rizobactérias de feijão preto (*Phaseolus derasus*) contra patógenos bacterianos um estudo preliminar. **Anuário Pesquisa e Extensão Unoesc Videira**, v. 3, p. e19684, 2018.
- BAO, C. Y.; GU, G. P.; ZHANG, M. K. Effects veterinary antibiotics stress on growth and antibiotics accumulation of *Oenanthe javanica* DC. **Chinese Journal of Soil Science**, v. 47, n. 1, p. 164–172, 2016.
- BELO, A. P. M. et al. Fenologia, biometria e precocidade de plantas de caju arbóreo do cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz.). **Ciência Florestal**, v. 29, n. 4, p. 1672–1684, 2019.
- BUCKSETH, T. et al. Effect of streptomycin and gentamycin on *in vitro* growth and cultural contaminants of potato cultivars. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 12, p. 4038–4043, 2017.
- CALVO, P. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). **Ecología Aplicada**, v. 9, n. 1, p. 31–39, 2010.
- CARVALHO, J. T. de G. de et al. Medicinal plants from Brazilian Cerrado: Antioxidant and anticancer potential and protection against chemotherapy toxicity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–16, 2019.
- CERNY, G. Method for the distinction of gramnegative from grampositive bacteria. **European Journal of applied Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 223–225, 1976.
- CHEONG, E. J.; NA, M.; JEONG, U. The effect of endophytic bacteria on *in vitro* shoot growth of *Prunus yedoensis* and its identification and elimination. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 103, p. 1–7, 2019.
- COHN, A. S. et al. Forest loss in Brazil increases maximum temperatures within 50 km. **Environmental Research Letters**, v. 14, n. 8, p. 2–15, 2019.
- CONTESINI, F. J.; MELO, R. R. de; SATO, H. H. An overview of *Bacillus* proteases: From production to application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 321–334, 2018.
- COSTESSI, A. et al. Novel sequencing technologies to support industrial biotechnology. **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, n. 16, p. 1–13, 2018.
- CRUZ, L. M. et al. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* L.) Merrill. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2375–2379, 2001.

- ELSHAGHABEE, F. M. F. et al. *Bacillus* as potential probiotics: Status, concerns, and future perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1490, 2017.
- ESLAMI, S.; SARLAK, M. Forced degradation tests of ampicillin in medication forms. **MedBioTech Journal**, v. 2, n. 3, p. 113–117, 2018.
- FERREIRA, E.; CAVALCANTI, P.; NOGUEIRA, D. ExpDes.pt: Experimental Designs package. R package (Português) version 1. 2013.
- GERSZBERG, A.; GRZEGORCZYK-KAROLAK, I. Influence of selected antibiotics on the tomato regeneration in *in vitro* cultures. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 47, n. 3, p. 558–564, 2019.
- GOPINATH, S. C. B. et al. Biotechnological processes in microbial amylase production. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–9, 2017.
- HUANG, Y.; YUAN, S.; CHEN, F. Establishment of an efficient micropropagation system in *Anthurium* hybrids through *in vitro* callogenesis and suspension culture. **The Horticulture Journal**, p. UTD112, 2020.
- IUCN – International Union for Conservation of Nature. **The IUCN red list of threatened species**. Version 2020-1. Available in: <www.iucnredlist.org>. Access in: March, 14, 2020.
- KAI, S. et al. Rapid bacterial identification by direct PCR amplification of 16S rRNA genes using the MinION TM nanopore sequencer. **FEBS Open Bio**, v. 9, n. 9, p. 548–557, 2019.
- KHAN, T. et al. Molecular identification and control of endophytic contamination during *in vitro* plantlet development of *Fagonia indica*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, n. 8, p. 1–9, 2018.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger Datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.
- LIU, H. et al. Inner plant values: Diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–17, 2017.
- LIU, X. et al. Response of ginger growth to a tetracycline-contaminated environment and residues of antibiotic and antibiotic resistance genes. **Chemosphere**, v. 201, p. 137–143, 2018.
- MAHMOUD, S. N.; AL-ANI, N. K. Effect of different sterilization methods on contamination and viability of nodal segments of *Cestrum nocturnum* L. **International Journal of Research Studies in Biosciences**, v. 4, n. 1, p. 4–9, 2016.
- MCCULLOCH, L.; PIRONE, P. P. Bacterial leaf spot of *Dieffenbachia*. **Phytopathology**, v. 29, n. 11, 1939.

- METWALY, A.; SALAMA, G. M.; ALI, G. A. Using hydrogen peroxide for reducing bacterial contamination in date palm tissue culture. **International Journal of Advances in Agricultural Science and Technology**, v. 5, n. 4, p. 25–33, 2018.
- MINDEN, V. et al. Antibiotics impact plant traits, even at small concentrations. **AoB PLANTS**, v. 9, n. 2, p. 1–19, 2017.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 474–497, 1962.
- NASCIMENTO, A. L. S. et al. Extração de DNA em mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Nucleus**, v. 14, n. 2, p. 97–106, 2017.
- OLIVEIRA, H. R. et al. Geographical ecology and conservation of *Eugenia* L. (Myrtaceae) in the Brazilian Cerrado: Past, present and future. **Austral Ecology**, v. 44, n. 1, p. 95–104, 2019.
- ORLIKOWSKA, T.; NOWAK, K.; REED, B. Bacteria in the plant tissue culture environment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, n. 3, p. 487–508, 2017.
- OSANI, O. M.; VEENA, P.; KUMAR NAILWAL, T. A Review on plant tissue culture, a technique for propagation and conservation of endangered plant species. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 7, p. 3778–3786, 2018.
- PAN, M.; CHU, L. M. Fate of antibiotics in soil and their uptake by edible crops. **Science of the Total Environment**, v. 599–600, p. 500–512, 2017.
- PANKHURST, C. E. Symbiotic effectiveness of antibiotic-resistant mutants of fast-and slow-growing strains of *Rhizobium* nodulating Lotus species. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 23, n. 8, p. 1026–1033, 1977.
- QUAMBUSCH, M.; WINKELMANN, T. Bacterial endophytes in plant tissue culture: Mode of action, detection, and control. In: VÍCTOR M. LOYOLA-VARGAS AND NEFTALÍ OCHOA-ALEJO (Ed.). **Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology**. New York: Humana Press, 2018. 1815p. 69–87.
- RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Amikacin: Uses, resistance, and prospects for inhibition. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2267, 2017.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2019.
- RIAZ, L. et al. Physiological and antioxidant response of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings to fluoroquinolone antibiotics. **Chemosphere**, v. 177, p. 250–257, 2017.
- RIBEIRO, A. S.; PAMPHILE, J. A. Micro-organismos endofíticos e seu potencial biotecnológico. **Revista UNINGÁ Review**, v. 29, n. 3, p. 88–93, 2017.
- SALLES, E. A. P. B. et al. Desinfestação e introdução *in vitro* de segmentos nodais de *Acacia mearnsii*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 37, n. 92, p. 485–491, 2017.

- SANT'ANA, C. et al. *In vitro* propagation of *Campomanesia rufa*: An endangered fruit species. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n. 4, p. 372–380, 2018.
- SANTOS, C. H. B. et al. Promoting fruit seedling growth by encapsulated microorganisms por meio de microrganismos encapsulados. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n. 3, p. 1–9, 2018.
- SANTOYO, G. et al. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, p. 92–99, 2016.
- SAVI, D. C.; ALUIZIO, R.; GLIENKE, C. Brazilian Plants: An unexplored source of endophytes as producers of active metabolites. **Planta Medica**, v. 85, n. 8, p. 619–636, 2019.
- SHAFI, J.; TIAN, H.; JI, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: A review. **Revista Mexicana de Fitopatología** **Revista Mexicana de Fitopatología**, v. 36, n. 1, p. 95–130, 2017.
- SHEHATA, H. R. et al. Relevance of *in vitro* agar based screens to characterize the anti-fungal activities of bacterial endophyte communities. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2016.
- SILVA, D. L. da et al. Antioxidant capacity of Cerrado fruits. **Desafios**, v. 6, n. Especial, p. 127–133, 2019.
- TAHIR, H. A. S. et al. Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–11, 2017.
- TEIXEIRA DA SILVA, J. A. et al. The effect of antibiotics on the *in vitro* growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTCLs). **Scientia Horticulturae**, v. 97, n. 3–4, p. 397–410, 2003.
- TERTIGAS, D.; BARBER, G. Determining the rate of development of antibiotic resistance to streptomycin and doxycycline in *Escherichia coli*. **Sciential-McMaster Undergraduate Science Journal**, n. 3, p. 2–7, 2019.
- TORRES, G. R. C.; HOULLOU, L. M.; DE SOUZA, R. A. Control of contaminants during introduction and establishment of *Bambusa vulgaris in vitro*. **Research in Biotechnology**, v. 7, p. 58–67, 2016.
- VILLARREAL-DELGADO, M. F. et al. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v. 36, n. 1, p. 95–130, 2018.
- VILLARROEL, D. et al. New botanical discoveries in *Eugenia* (Myrtaceae) from Bolivia and Brazil. **Phytotaxa**, v. 253, n. 4, p. 266–274, 2016.
- YASMIN, S. et al. Plant growth promotion and suppression of bacterial leaf blight in rice by inoculated bacteria. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–19, 2016.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by Polymerase Chain Reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 7, p. 2271–2277, 1991.