



NÁDIA ALVES CAMPOS

**ESTRATÉGIAS PARA CONSERVAÇÃO *IN*
VITRO DE GABIROBEIRA
(*Campomanesia pubescens*):
MICROPROPAGAÇÃO, UNIDADES
ENCAPSULÁVEIS E CRIOPRESERVAÇÃO**

LAVRAS – MG

2014

NÁDIA ALVES CAMPOS

**ESTRATÉGIAS PARA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GABIROBEIRA
(*Campomanesia pubescens*): MICROPROPAGAÇÃO, UNIDADES
ENCAPSULÁVEIS E CRIOPRESERVAÇÃO**

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

Orientador

Renato Paiva, Ph.D

Coorientador

Rony Swennen, Ph.D – K.U.Leuven

Supervisor

Bartholomeus J. Panis, Ph.D – Bioversity International

LAVRAS - MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Campos, Nádia Alves.

Estratégias para conservação *in vitro* de gabirobeira
(*Campomanesia pubescens*): micropropagação, unidades
encapsuláveis e criopreservação / Nádia Alves Campos. – Lavras :
UFLA, 2014.

109 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Renato Paiva.

Bibliografia.

1. Crioconservação. 2. Propagação vegetativa. 3. Semente
sintética. 4. Frutas do cerrado. 5. Myrtaceae. I. Universidade Federal
de Lavras. II. Título.

CDD – 634.42

NÁDIA ALVES CAMPOS

**ESTRATÉGIAS PARA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GABIROBEIRA
(*Campomanesia pubescens*): MICROPROPAGAÇÃO, UNIDADES
ENCAPSULÁVEIS E CRIOPRESERVAÇÃO.**

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

APROVADA em 12 de março de 2014.

Dr. Breno Régis Santos	UNIFAL
Dra. Fernanda Carlota Nery	UFSJ
Dr. Luciano Coutinho Silva	UFLA
Dr. Paulo Augusto Almeida Santos	UFLA

Renato Paiva, Ph.D
Orientador

LAVRAS – MG

2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Universidade Federal de Lavras por toda a minha formação profissional, pelas oportunidades e por me proporcionar grandes experiências profissionais e pessoais.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo durante o curso e à CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche.

À KULeuven e a todas as pessoas com quem trabalhei, pela grande oportunidade e por tudo que lá aprendi, em especial ao Bart Panis pela paciência, amizade, ensinamentos e contribuição científica.

Ao Setor de Fisiologia Vegetal da UFLA e a todos os professores, pelos ensinamentos, incentivos, troca de experiências e boa convivência durante todos esses anos. Também a todos os funcionários que colaboram para o bom andamento daquele setor e por serem sempre tão prestativos.

Meu agradecimento especial ao meu orientador Renato Paiva, por todas as oportunidades dadas a mim, pela confiança, incentivo e conselhos que hoje, com certeza, fazem de mim uma profissional melhor. E também pelo exemplo, que é a melhor forma de ensinar.

Ao Rodrigo Therezan pela ajuda na condução deste trabalho, pela companhia na Bélgica, pelas muitas risadas dadas dos furos, por me ouvir nos momentos de aflição, enfim, pela amizade em todos os momentos.

Ao aluno do Núcleo Rural Lagoinha, Josias, por me ajudar nas coletas sempre que necessário.

A todos os meus colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, pelos bons momentos compartilhados, experiências trocadas e aprendizado em conjunto. Especialmente a Tina pela amizade desde o primeiro momento.

Ao Luciano Coutinho por toda ajuda com o doutorado sanduíche e pelas dicas de como viver na Bélgica. Além do apoio nas dúvidas e questões teórico-práticas, amizade e ajuda essencial na conclusão deste trabalho. Pelo exemplo de profissionalismo e sabedoria.

Ao Diogo por ser sempre prestativo, pelo incentivo inicial e pela amizade construída nesse tempo.

Aos meus amigos da Fisiologia Vegetal pela amizade, pela convivência, ajuda, crescimento mútuo, risadas e lágrimas. Sem vocês teria sido bem mais difícil. A Marília Mércia e ao Helbert por dividirem comigo o peso do pior momento desse doutorado. São muitos os nomes, mas sou muito grata pelos amigos que aqui fiz, pela convivência tão especial e por todo apoio que sempre recebi deles.

Aos “Brasileiros em Leuven” por me acolherem tão bem, pelos ótimos momentos vividos e por serem a minha família na Bélgica. Em especial à minha grande amiga Letícia por ter sido meu anjo da guarda lá.

Aos meus amigos de Nepré, pela eterna amizade, apoio e incentivo, por compreenderem as ausências e fazerem dos reencontros momentos únicos. Especialmente a Mariana pelo companheirismo de mais de 20 anos.

Às grandes amigas que o mestrado me deu, Fabiana, Brenda, Ingrid, Cássia, Glacy, Dani e Elizângela, pelos reencontros felizes, incentivo, parceria e amizade para a vida inteira.

A Mel, que está nessa comigo desde os primeiros passos, por partilhar tantas histórias, tantas experiências... pelo apoio, pelo ombro amigo em todos os momentos, pelo crescimento profissional e pessoal sempre compartilhado, enfim, pela grande amizade que foi iniciada nessa universidade.

A Patrícia e ao Ricardo pelo constante apoio nos momentos difíceis. E principalmente pela amizade, risadas e incentivo.

À minha professora de inglês e amiga Eliany Cicarelli, por me ajudar imensamente a conquistar os meus objetivos, pela paciência, amizade, conselhos e convivência num momento tão importante.

Para expressar toda a minha gratidão à minha família ainda faltam palavras. Queria agradecer imensamente ao meu pai, por sempre me incentivar e acreditar em mim muito mais do que eu mesma. Ao meu irmão Renan, pelo carinho. À minha irmã Laís, por ser muito mais do que uma irmã, ser minha melhor amiga, companheira, cúmplice, parceira. Por ter enfrentado o medo de avião e ido me visitar e fazer com que aqueles momentos fossem os melhores da temporada no exterior. À minha mãe, pelo apoio incondicional em todos os momentos. Por me ouvir, me acompanhar, me cuidar, me acolher, enfim, por tudo. Por ser meu maior exemplo e orgulho na vida.

Ao Zé, Lui, Ned, MaryDjane, Astra, Zick e Bethoven por fazerem a minha vida sempre mais alegre!

Não poderia deixar de agradecer a Deus, por me permitir chegar até aqui e por todas as bênçãos que recebo e sempre recebi apesar de todas as minhas falhas.

Ninguém chega a lugar algum sozinho, então fica aqui o meu agradecimento a todas as pessoas que passaram pela minha vida, deixando lições profissionais ou pessoais. Tudo o que sou hoje é devido a essas experiências. E tudo que conquistei tem uma parte de todos vocês.

O meu muito obrigada!

Biografia

Nádia Alves Campos, filha de Gilvânia Mello Alves e João Vieira Campos Neto, nasceu em Três Pontas-MG no dia 08 de abril de 1985, mas sempre viveu em Nepomuceno-MG, onde cursou o 1º e 2º graus nas Escola Abreu Carvalho e Escola Estadual Ernani Vilela Lima, se formando no 2º grau em dezembro de 2002. Em fevereiro de 2003, iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas – Bacharelado, na Universidade Federal de Lavras, se formando em 2007. Em agosto de 2008 iniciou o curso de mestrado em Biotecnologia Vegetal pela mesma universidade. Em julho de 2010, concluiu o mestrado e, em agosto do mesmo ano, iniciou o doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal sob orientação do Prof. Renato Paiva, Ph.D. Durante o curso de doutorado realizou estágio internacional na modalidade doutorado sanduíche de um ano na K.U.Leven, em Leuven-Bélgica, sob orientação do Prof. Rony Swennen e do pesquisador Bart Panis, onde trabalhou com micropropagação e criopreservação. Concluiu o doutorado em 12 de março de 2014.

RESUMO GERAL

A gabirobeira (*Campomanesia pubescens*) é uma espécie frutífera do Cerrado, que além do potencial para exploração comercial, apresenta importantes propriedades medicinais. Como espécie nativa do Cerrado, a gabirobeira, assim como o Bioma ao qual pertence, vem sofrendo com o desmatamento e corre o risco de desaparecer. Essa espécie possui sementes recalcitrantes, que não suportam dessecação e armazenamento em baixa temperatura, manejos que são a base das metodologias convencionais de armazenamento e conservação da biodiversidade. Espécies com essa particularidade podem ser conservadas por meio de técnicas *in vitro*, como a micropropagação e a criopreservação. Diante disso, o objetivo geral deste trabalho foi desenvolver estratégias que permitam a conservação da gabirobeira usando técnicas alternativas. Foram testados a micropropagação, produção e armazenamento de unidades encapsuláveis e criopreservação de ápices caulinares. Para a micropropagação foram testados meios para indução de brotações com diferentes concentrações de BAP, sendo recomendada a utilização do MS acrescido de 4,4 μM de BAP. A fase de enraizamento mostrou-se difícil de obtenção *in vitro*, porém em um teste preliminar indicou ser possível *ex vitro* com a utilização do pó comercial de enraizamento Rootone[®]. A produção de unidades encapsuláveis de gabirobeira foi obtida com a utilização de ápices caulinares como explantes em MS ou água como constituinte das cápsulas. O armazenamento das cápsulas a 4°C foi possível por sete dias sem o comprometimento da ruptura e desenvolvimento das plântulas. Na criopreservação de ápices caulinares, foi estabelecido o meio para crescimento dos ápices em meio MS com adição de 2,2 ou 4,4 μM de BAP. O pré-cultivo em meio com alta concentração de sacarose tem efeito positivo na sobrevivência dos explantes, sendo essencial para obtenção do sucesso da técnica nessa espécie. A criopreservação foi obtida com sucesso de aproximadamente 50% com o tratamento por 15 ou 30 minutos de PVS2. Alguns parâmetros ainda necessitam de otimização, porém, os dados obtidos apontam direções satisfatórias para a preservação de *Campomanesia pubescens*, que podem também auxiliar na preservação de outras espécies do Cerrado.

Palavras-chave: Criopreservação. *Droplet Vitrification*. Cerrado. Frutífera. Planta Medicinal.

GENERAL ABSTRACT

The gabirobeira (*Campomanesia pubescens*) is a fruitful species from Cerrado, which in addition to the potential for commercial exploitation, has important medicinal properties. As a native plant from Cerrado, *C. pubescens*, as its biome, has suffered with deforestation and runs the risk of disappearing. This species has recalcitrant seeds, which do not support desiccation and storage at low temperature, which are the basis of conventional methods of storage and biodiversity conservation. Species with this characteristic can be preserved by *in vitro* techniques, such as micropropagation and cryopreservation. Therefore, the aim of this study was to develop strategies to enable the conservation *C. pubescens* through unconventional techniques. Micropropagation, production and storage of encapsulated units and cryopreservation of shoot tips were tested. For micropropagation, a medium for shoot induction with different BAP concentrations were tested, and the use of MS supplemented with 4.4 μM BAP is recommended. The rooting phase proved quite difficult to obtain *in vitro*, but a preliminary test showed that *ex vitro* rooting is possible using the commercial rooting powder Rootone[®]. The production of encapsulated units was obtained with the use of shoot tip explants and MS or water as capsules constituent. Storage of the capsules at 4°C for 7 days was possible without compromising the capsule rupture and development of seedlings. In relation to cryopreservation of shoot tips, the growth medium was established as MS, with addition of 2.2 or 4.4 μM BAP. The preculture in medium rich in sucrose is effective in survival of explants, and is essential for achieving success in this kind of technique. Cryopreservation was obtained with 50% success with the treatment for 15 or 30 minutes in PVS2. Some parameters still need optimization, however, the data indicate satisfactory directions for preserving *Campomanesia pubescens*, which can also aid in the preservation of other species from Cerrado.

Keywords: Criopreservation. Droplet Vitrification. Cerrado. Fruitful Plant. Medicinal Plant.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Teste para o enraizamento utilizando o pó comercial Rootone®59
- Figura 2 Enraizamento de gabirobeira com a utilização de Rootone®59

CAPÍTULO 4

- Figura 1 Ápices caulinares (A) e gemas axilares (B) de *C. pubescens*.....92
- Figura 2 Ápices caulinares de *C. pubescens* após o tratamento com PVS2..... 100
- Figura 3 Ápices caulinares de *C. pubescens* após 60 dias da criopreservação em meio MS suplementado com 4,4 µM de BAP..... 104

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO 2

Gráfico 1	Média do número de brotações de gabirobeira em meio MS com diferentes concentrações de BAP após seis semanas de cultivo <i>in vitro</i>	50
Gráfico 2	Média do número de folhas de gabirobeira em meio MS com diferentes concentrações de BAP após seis semanas de cultivo <i>in vitro</i>	51
Gráfico 3	Média do nº de brotações de gabirobeira em meio MS com diferentes concentrações de BAP após seis semanas de cultivo <i>in vitro</i>	52
Gráfico 4	Média do nº de folhas de gabirobeira em meio MS com diferentes concentrações de BAP após seis semanas de cultivo <i>in vitro</i>	52
Gráfico 5	Porcentagem de explantes com formação de calo na base após seis semanas de cultivo	54
Gráfico 6	Média do número de segmentos caulinares contendo um par de gemas gerados por broto em cada tratamento após seis semanas de cultivo em meio com diferentes concentrações de BAP.....	55
Gráfico 7	Porcentagem do número de raízes de gabirobeira em meio MS com diferentes concentrações de AIB após seis semanas de cultivo.....	57

CAPÍTULO 3

- Gráfico 1 Taxa de ruptura de cápsulas de alginato compostas de meio MS ou apenas água contendo como explantes ápices caulinares, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade77
- Gráfico 2 Taxa de ruptura de cápsulas de alginato constituídas de água destilada ou meio MS e contendo gemas axilares de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade78
- Gráfico 3 Análise de regressão para rompimento de cápsulas de alginato de sódio após 30 dias em função do tempo de armazenamento a 4 °C.....80

CAPÍTULO 4

- Gráfico 1 Explantes apicais e axilares de *C. pubescens* em meio MS com diferentes concentrações de BAP após 30 dias de cultivo.....97
- Gráfico 2 Efeito do pré-cultivo na sobrevivência de ápices caulinares de *C. pubescens* após 30 dias de cultivo98
- Gráfico 3 Porcentagem de sobrevivência de explantes apicais de *C. pubescens* em relação ao tempo de exposição ao PVS2.....99
- Gráfico 4 Média do número de folhas em ápices caulinares de *C. pubescens* após diferentes tempos de exposição ao PVS2100
- Gráfico 5 Porcentagem de explantes sobreviventes após a criopreservação com diferentes tempos de exposição ao PVS2 ...103

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução Geral	15
1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	Descrição da espécie	17
2.2	Conservação da biodiversidade	19
2.3	Cultivo <i>in vitro</i>	21
2.4	Unidades encapsuláveis	24
2.5	Criopreservação como alternativa para a preservação da diversidade vegetal	25
	REFERÊNCIAS	29
	CAPÍTULO 2 Micropropagação de gabirobeira (<i>Campomanesia pubescens</i>)	40
1	INTRODUÇÃO	42
2	MATERIAIS E MÉTODOS	45
2.1	Material vegetal	45
2.2	Estabelecimento <i>in vitro</i>	45
2.3	Indução de brotações	46
2.4	Enraizamento <i>in vitro</i>	47
2.4.1	Enraizamento de brotações após dois subcultivos: efeito do AIB	47
2.4.2	Enraizamento de brotações após oito subcultivos	47
2.4.2.1	Efeito do AIB e AIA no enraizamento de brotações	47
2.4.2.2	Efeito do ANA no enraizamento de brotações	48
2.4.2.3	Condições de cultivo durante o enraizamento e avaliações	48
2.5	Análises estatísticas	49
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
3.1	Indução de brotações	50
3.2	Enraizamento	57
3.2.1	Efeito do AIB no enraizamento de brotações após dois subcultivos	57
3.2.2	Efeito do AIB, AIA e carvão ativado no enraizamento	58
4	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS	63
	CAPÍTULO 3 Influência do tipo de explante e constituição da cápsula na produção e armazenamento de unidades encapsuláveis de gabirobeira (<i>Campomanesia pubescens</i>).....	69
1	INTRODUÇÃO	71
2	MATERIAIS E MÉTODOS	74
2.1	Material vegetal	74

2.2	Produção de unidades encapsuláveis.....	74
2.3	Armazenamento à baixa temperatura.....	75
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	77
3.1	Unidades encapsuláveis	77
3.2	Encapsulamento e armazenamento.....	79
4	CONCLUSÕES.....	82
	REFERÊNCIAS.....	83
	CAPÍTULO 4 Criopreservação de ápices caulinares de gabiroleira via <i>droplet vitrification</i>.....	88
1	INTRODUÇÃO	90
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	92
2.1	Material vegetal	92
2.2	Meio de regeneração de ápices caulinares e gemas axilares	92
2.3	Efeito do pré-cultivo e do tempo de exposição ao PVS2	93
2.4	Criopreservação, reaquecimento e retomada do crescimento	94
2.5	Análises estatísticas.....	95
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	96
3.1	Regeneração de ápices caulinares e gemas axilares	96
3.2	Pré-cultivo e exposição ao PVS2.....	98
3.3	Criopreservação e retomada do crescimento	102
4	CONCLUSÕES.....	105
	REFERÊNCIAS.....	106

CAPÍTULO 1 Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado é um complexo bioma, tipicamente brasileiro, com grande diversidade de *habitats*. Essa biodiversidade extremamente rica está compreendida em uma área de mais de 2 milhões km² que ocupa cerca de 23% do território nacional. No entanto, calcula-se que aproximadamente 55% dessa área venham sofrendo com o desmatamento causado principalmente pela expansão das fronteiras agrícolas e pela ocupação humana desordenada (KLINK; MACHADO, 2005; GALHARTE; CRESTANA, 2010; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2014).

Diversas espécies vegetais de importância econômica são encontradas no bioma Cerrado, com grande potencial para produção sustentável de gêneros essenciais à humanidade, como alimentos e medicamentos, além de exploração na indústria de cosméticos (SANTOS, 2001; MACHADO et al., 2004). Dentre essas espécies pode-se citar a *Campomanesia pubescens* O. Berg, popularmente conhecida como gabirobeira, é uma frutífera arbustiva e que pertence à família Myrtaceae. Frutos de espécies pertencentes a esse gênero são utilizados para o consumo *in natura*, fabricação de doces, licores, e as folhas apresentam propriedades medicinais importantes como no combate à diarreia, febre, escorbuto e doenças das vias urinárias (ALICE et al., 1995). Recentemente, atividades antibacterianas e até mesmo influências na redução do nível de colesterol e no controle da diabetes estão sendo comprovadas (CARDOSO et al., 2010; KLAFKE et al., 2010; VINAGRE et al., 2010).

As sementes de *C. pubescens* são consideradas recalcitrantes, ou seja, apresentam alto teor de água no momento da dispersão e não suportam desidratação, sendo por isso de difícil armazenamento, uma vez que a

metodologia convencional de conservação de sementes frequentemente utiliza a secagem e o armazenamento em câmaras com baixas temperaturas como forma de preservar a viabilidade das mesmas (BARBEDO; BILIA, 1998; SANTOS, 2001, DOUSSEAU et al., 2011). Esse tipo de semente geralmente apresenta atividade metabólica intensa, tanto durante sua formação, quanto após sua colheita (BARBEDO; MARCOS FILHO 1998, CASTRO et al., 2004). Assim, métodos para o armazenamento de sementes recalcitrantes devem obrigatoriamente considerar a redução do metabolismo (ANDRÉO et al., 2006). Neste contexto, a biotecnologia tem fornecido diversas opções para conservação da biodiversidade. Para conservação em curto ou médio-prazo, tem-se utilizado com sucesso as técnicas de crescimento lento, micropropagação e produção de unidades encapsuláveis (PAUNESCU, 2009; ENGELMANN, 2011; PILATTI et al., 2011).

A criopreservação tem sido vista como técnica promissora para o armazenamento em longo prazo dos recursos genéticos vegetais. Além disso, tem sido considerada a técnica de maior potencial para preservar espécies que se propagam vegetativamente ou que possuem sementes intermediárias ou recalcitrantes (SANTOS, 2000; PANIS et al., 2005; ENGELMANN, 2011; CRUZ-CRUZ, 2013).

Diante da necessidade da conservação da diversidade genética e dos poucos estudos a esse respeito direcionado às espécies do Cerrado, em especial às espécies do gênero *Campomanesia*, o objetivo deste trabalho Estudar a aplicação de diferentes técnicas in vitro como a micropropagação, produção de unidades encapsuláveis e criopreservação em gabirobeira com o intuito de aprimorar a conservação desta espécie.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Descrição da espécie

A espécie *Campomanesia pubescens* popularmente conhecida (de acordo com a região onde é encontrada) como gabirobeira, guabiroba, guabiroba-do-campo, guariroba ou guavira, é uma planta nativa do Cerrado pertencente à família Myrtaceae na qual está incluído cerca de 130 gêneros e mais de 4.000 espécies (SOUZA; LORENZZI, 2008; OLIVEIRA et al., 2011).

A família Myrtaceae está entre as mais comuns na maioria das formações vegetais da flora brasileira e seus representantes podem ser encontrados no Cerrado nos estados de São Paulo, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, Bahia, Minas Gerais e Santa Catarina, chegando às regiões adjacentes do Paraguai e Argentina (SOUZA; LORENZZI, 2008). Nas áreas abertas, especialmente no Cerrado, ganham importância os gêneros *Psidium* e *Campomanesia*.

Espécies do gênero *Campomanesia* podem ser encontradas na forma de subarbustos ou arbustos de 0,3 m até 2 m de altura ou árvores de 8 a 15 metros de altura (PEIXOTO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2011). Na espécie em foco neste trabalho, *C. pubescens*, o florescimento ocorre de forma intensa, porém por um curto período de tempo (ALMEIDA et al., 1998), que vai geralmente de agosto a novembro, com pico em setembro e frutificando de setembro a dezembro (SILVA et al., 2001). As flores são brancas e os frutos são globosos possuindo de 2,0 a 2,5 cm de diâmetro com polpa amarelada quando madura. As sementes são pequenas, pardas (FERREIRA, 1972; SILVA et al., 2009) e possuem mucilagem intimamente aderida, porém não foram encontradas substâncias inibidoras da germinação nessa mucilagem, não sendo portanto, um componente que interfira nesse processo (MELCHIOR, 2006). O

comportamento ecofisiológico de suas sementes é classificado como recalcitrante (MELCHIOR et al., 2006, DOUSSEAU et al., 2011).

É considerada uma espécie final de sucessão ecológica e suporta certo grau de inundação, sendo uma espécie importante para a reposição de mata ciliar (DURIGAN et al., 2007). Podendo ser utilizada também para reflorestamento de áreas contaminadas e em áreas degradadas, além de utilizada como planta ornamental (GOGOSZ, 2010; SOUZA; LORENZI, 2008).

Possui grande potencial para exploração econômica por apresentar características agrônomicas desejáveis, como alta produção de frutos e elevados níveis de brix (MELCHIOR et al., 2006). Vinhos e licores preparados com frutos da gabirobeira foram testados e aprovados em análises sensoriais (DUARTE et al., 2009; SANTOS et al., 2013). O suco de gabiroba possui altos níveis de vitamina C, cerca de 240 mg 100 mL⁻¹, sendo maior que os níveis encontrados nos sucos de bacuri, carnaúba, cajá, jabuticaba e jambolão, todas frutas tropicais consideradas exóticas (SANTOS et al., 2013). A degradação dessa substância com o tempo de armazenamento também é menor se comparado com os sucos de goiaba, limão e laranja (SANTOS et al., 2013).

As folhas, frutos e mesmo o ritidoma (casaca do caule) da gabirobeira são utilizados na medicina popular no combate a desordens do trato urinário e diarreias por conferir ação adstringente (RODRIGUES; CARVALHO, 2001). O fruto por apresentar alto teor de vitamina C, é também usado contra gripes e resfriados (RODRIGUES; CARVALHO, 2001; MARKMAN et al., 2004).

Especialmente no sul do Brasil, o chá das folhas de gabirobeira (*C. xanthocarpa*) é usado para auxiliar na redução da obesidade (BIAVATTI et al., 2004; DICKEL et al., 2007). Também já é comprovado que o extrato das folhas de outras espécies do gênero *Campomanesia* possuem atividade antibiótica e auxilia no controle da diabetes. Vinagre et al. (2010) mostraram que o chá das folhas reduziu os níveis de glicose no sangue, inibindo a quebra de glicogênio e

prevenindo alterações patológicas no pâncreas e rins de indivíduos afetados por esta doença. Pavan et al. (2009) estudaram a ação do acetato de etila dos frutos e verificaram sua ação contra o patógeno causador da tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*). Cardoso et al. (2010) confirmaram a ação do extrato das folhas de *C. xanthocarpa* contra seis espécies diferentes de bactéria e Klafke et al. (2010) na redução do colesterol em pacientes acometidos pela hipercolesterolemia. Ainda estudando o efeito desse extrato sobre doenças do sangue, Klafke et al. (2011) mostraram o efeito positivo na prevenção de trombozes. O chá das folhas *Campomanesia* spp. também mostram atividades gastroprotetora e antiúlcera, além de atividade anti-inflamatória (MARKMAN et al., 2004; MALDALOSO et al., 2012; FERREIRA et al., 2013).

A exploração da gabirobeira se dá pelo extrativismo e, também, pelo cultivo em pequenos pomares familiares, sendo uma fonte de renda para muitas famílias. Nos últimos anos, tem sido observado um aumento da importância socioeconômica da utilização da gabirobeira, em especial, na região centro-oeste do país, onde seus frutos são vendidos para fábricas de picolés e doces, porém o desenvolvimento lento da plântula e a alta predação de seus frutos dificulta o cultivo comercial (SOUZA; LORENZZI, 2008, OLIVEIRA et al, 2011).

Embora existam diversos trabalhos sobre as propriedades medicinais de *Campomanesia* spp., estudos com o intuito de conservação são ainda muito escassos.

2.2 Conservação da biodiversidade

O bioma Cerrado apresenta biodiversidade vegetal extremamente rica, com destaque para as espécies frutíferas, exercendo importante papel no hábito de consumo da população brasileira (PILATTI et al., 2011). Contudo, o extrativismo predatório e o desrespeito às leis de proteção ambiental levam às

altas taxas de destruição do Cerrado colocando em risco real a sobrevivência de diversas espécies, algumas antes mesmo de serem classificadas pelos pesquisadores (VIEIRA; MARTINS, 2000; MACHADO et al., 2012). Apenas 0,5% da área total do Cerrado é protegida por unidades de conservação de uso restrito e apenas 3,6% estão protegidas por alguma outra categoria de unidade de conservação como parques e reservas ambientais (FELFILI et al., 2004; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2014).

Na tentativa de diminuir o impacto causado pela degradação na biodiversidade, não só do Cerrado, tem-se utilizado duas estratégias de conservação: conservação *in situ* e *ex situ*. A conservação *in situ* ocorre no *habitat* natural da planta, como em reservas e parques ecológicos, enquanto que a *ex situ* é feita em condições diferentes às do *habitat* natural, como em bancos de germoplasmas, ou mesmo combinando os métodos de conservação de maneira complementar. A seleção de um ou de vários métodos depende das necessidades, possibilidades e da espécie em questão (SANTOS; BETTENCOURT, 2002; PAUNESCU, 2009; ENGELMANN, 2011). A maioria dos esforços de conservação *ex situ* tem sido feita até agora em relação à espécies cultivadas, entretanto com o crescente desmatamento, a conservação de espécies selvagens, raras ou ameaçadas de extinção tem aumentado consideravelmente (ENGELMANN, 2011).

Uma das maneiras mais eficientes de conservação da biodiversidade é a que ocorre sob a forma de bancos de sementes. No entanto, podem ocorrer alguns entraves na utilização desse tipo de armazenamento, já que algumas plantas não produzem sementes (sendo propagadas vegetativamente), outras espécies têm sementes que se deterioram rapidamente devido à ação de patógenos e outras produzem sementes não ortodoxas (ENGELMANN, 2011).

Técnicas de cultura de tecidos têm sido desenvolvidas e aplicadas com sucesso na preservação de diversas espécies (ENGELMANN, 2011; PILATTI et

al., 2011), no entanto é de suma importância o desenvolvimento de estratégias para a multiplicação e armazenamento para cada espécie em estudo (ENGELMANN, 2011).

Para conservação em curto ou médio-prazo, tem-se utilizado com sucesso as técnicas de crescimento lento, micropropagação e produção de unidades encapsuláveis (PAUNESCU, 2009; ENGELMANN, 2011; PILATTI et al., 2011). Para a conservação de material biológico em longo prazo, a única alternativa atualmente é a criopreservação (ENGELMANN, 2011).

2.3 Cultivo *in vitro*

A aplicação das técnicas de cultivo *in vitro* pode minimizar ou mesmo resolver problemas na multiplicação de plantas frutíferas do Cerrado, já que muitas delas apresentam dificuldades de propagação, como a produção de sementes recalcitrantes ou com certo grau de dormência e heterogeneidade na maturação dos frutos. Além disso, pode promover a produção de mudas em larga escala, permitindo a inclusão de espécies em bancos de germoplasma e facilitar as trocas de materiais genéticos entre instituições de pesquisa (PINHAL et al., 2011).

A cultura de tecidos é a técnica que permite o crescimento *in vitro* de células, tecidos ou órgãos vegetais isolados a partir de uma planta-mãe, em meio de cultura e condições controladas (GEORGE, 2008). O cultivo *in vitro* é uma importante ferramenta biotecnológica utilizada com sucesso para propagação clonal de plantas, obtenção de plantas livres de patógenos, melhoramento e transformação genética, fertilização *in vitro*, resgate de embriões, conservação de germoplasma e também para produção de metabólitos secundários (GEORGE, 2008, ENGELMANN, 2011). Dentre as técnicas da cultura de tecidos, a micropropagação é uma das que tem tido maior destaque por sua

ampla aplicação prática (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; GEORGE, 2008).

Apesar disso, o nível de conhecimento sobre essa técnica em espécies nativas ainda é relativamente baixo, pois essas plantas encontram-se, na maioria, em estado selvagem, apresentando grande variabilidade genética (ALMEIDA, 2009, SOUZA et al., 2011).

A micropropagação engloba diferentes etapas, que vão desde o estabelecimento da cultura *in vitro* até seu enraizamento, culminando com a aclimatização da planta (BASTOS et al., 2007). O enraizamento é uma etapa crucial e que ainda se mostra como um dos grandes obstáculos para aplicação rotineira dessa técnica (DE KLERK, 2002), especialmente para espécies lenhosas (GEORGE et al., 2008). Essas fases são dependentes de diversos fatores, tanto fisiológicos e bioquímicos como ambientais, além disso, o fator genético pode influenciar fortemente nas respostas desejadas (ASSIS; MACHADO, 1998; FERREIRA et al., 2011).

A constituição do meio de cultura e dos reguladores de crescimento utilizados têm importância fundamental no desenvolvimento de culturas *in vitro*, especialmente para plantas lenhosas e nativas. Existe uma carência muito grande de informações com relação ao estabelecimento e cultivo *in vitro*, mais ainda, as respostas a essas substâncias podem variar muito dependendo das classes hormonais, tipos e concentrações utilizadas para a espécie objeto de estudo (PINHAL et al, 2011). Por isso há a necessidade de protocolos específicos para cada espécie e até mesmo para cultivares dentro da mesma espécie, quando se tratar de plantas cultivadas (SARASAN et al., 2006; GEORGE, 2008; ENGELMANN, 2011).

As auxinas e as citocininas estão dentre as classes hormonais mais utilizadas na cultura de tecidos. As auxinas são fundamentais na indução da divisão celular e indução de raízes, sendo também utilizadas nas fases de

multiplicação para favorecer o crescimento (MANTOVANI; FRANCO, 1998, BORGES et al., 2012). Já as citocininas são indispensáveis para a divisão e multiplicação celular, quebra de dominância apical, indução e proliferação de gemas axilares e diferenciação de gemas adventícias (PREECE, 1995; BIST et al., 2011). As giberelinas também são comumente utilizadas no cultivo *in vitro*, principalmente com o intuito de promover o alongamento das brotações que não tenham tamanho adequado para multiplicação ou enraizamento (MASUDA et al., 2012).

Com relação ao enraizamento, as auxinas são os fitorreguladores mais utilizados no estímulo de raízes adventícias. Entre elas, o AIB (ácido indolbutírico) tem sido bastante empregado por não causar fitotoxicidade aos explantes em uma larga faixa de concentração e ser eficiente para uma grande variedade de espécies (HARTMANN et al., 1997, DE KLERK et al., 1999). Entretanto, a alta concentração de auxina no meio de cultivo, ou a permanência do explante por tempo prolongado no meio, pode levar à formação de calos na base do explante causando prejuízos ao enraizamento. A fim de contornar esse problema, recomenda-se a utilização de dois meios de cultivo para esse processo. Primeiramente os explantes devem ser expostos a um meio de cultivo com adição de auxina para estimular a indução da formação dos primórdios radiculares, onde devem permanecer por cerca de uma semana. Passado o tempo para indução, as brotações são transferidas para um meio livre de regulador chamado meio de expressão, onde ocorrerá o crescimento das raízes (DE KLERK et al., 1999; LEITZKE et al., 2009).

A regeneração de plantas por micropropagação requer ainda uma fase de aclimatização, isso porque plantas vindas do cultivo *in vitro* são mais sensíveis a variações do ambiente por apresentarem algumas características morfoanatômicas diferentes das plantas desenvolvidas em condições ambientais não controladas. Algumas dessas características são a não formação de cutícula

espessa que auxilia a evitar altas taxas transpiratórias, paredes celulares sem a rigidez necessária para sustentação da planta e folhas delgadas com estômatos pouco funcionais e com taxa fotossintética muito baixa (GEORGE et al., 2008).

A fase de aclimatização envolve uma exposição gradual das plantas ao ambiente externo que possui umidade relativa mais baixa e variações das condições de luz e temperatura. Depois do crescimento sustentável em ambiente *ex vitro*, as plantas podem ser colocadas em condições de campo (COUTO et al., 2003; MOREIRA et al., 2006). O tipo de substrato utilizado nessa fase também deve ser observado, pois é o suporte para o crescimento da planta e tem grande influência no crescimento e desenvolvimento das plantas aclimatizadas (COUTO et al., 2003).

2.4 Unidades encapsuláveis

Outra técnica dentro da cultura de tecidos que pode ser útil na propagação e conservação de materiais vegetais é a produção de unidades encapsuláveis (SHARMA et al., 2013).

Inicialmente conhecida como “semente sintética”, a técnica consiste no encapsulamento de explantes (embriões somáticos e zigóticos, ápices caulinares e gemas laterais) em uma matriz de alginato (HUNG; TRUEMAN, 2012). Essa matriz de alginato protege os explantes contra danos físicos e ambientais e minimiza processos de desidratação (IKHLAQ et al., 2010).

É considerado um método simples, eficaz e barato de preservação de germoplasma (HUNG; TRUEMAN, 2012) sendo especialmente empregada em espécies que produzem sementes não viáveis ou que apresentem alguma dificuldade de propagação e conservação, como no caso das sementes recalcitrantes (DAUD et al., 2008, PAUNESCU, 2009).

Essa técnica tem tido especial atenção devido ao potencial de aplicação na conservação de germoplasma em médio e longo prazo e por facilitar a troca de material genético entre diferentes instituições de pesquisas mesmo de outros países (HUNG; TRUEMAN, 2012; SHARMA et al., 2013).

2.5 Criopreservação como alternativa para a preservação da diversidade vegetal

A técnica de criopreservação caracteriza-se pela manutenção de estruturas vegetais em temperaturas ultrabaixas, em nitrogênio líquido (-196 °C) ou em sua fase de vapor (aproximadamente -150 °C) (SANTOS, 2004). Sob essas temperaturas, todos os processos metabólicos e divisões celulares cessam, e assim o material vegetal pode ser armazenado sem danos ou alterações por, teoricamente, períodos de tempo indeterminado (CARVALHO; VIDAL, 2003).

A conservação em nitrogênio líquido apresenta diversas vantagens em relação às condições *in vitro*: as taxas de contaminação são menores, não há necessidade de subcultivos periódicos, o tempo de armazenamento é indeterminado e os custos de manutenção também são menores, além de garantir a conservação segura e eficiente de diversos tipos de explantes (ENGELMANN, 2004).

O sucesso da criopreservação é caracterizado por altas taxas de sobrevivência, manutenção das características fisiológicas, bioquímicas e estabilidade genética (URBANOVÁ et al., 2006). Para aplicação bem sucedida da criopreservação, é necessário que os tecidos sobrevivam à desidratação. Acima de determinados níveis de hidratação, a água torna-se congelável, podendo ocasionar danos devido à formação de cristais de gelo nos tecidos e levando à perda da viabilidade celular (FONSECA; FREIRE, 2003).

A principal consequência da formação de cristais de gelo é a ruptura mecânica das membranas e organelas celulares devido à expansão da água quando congelada. Tais eventos causaram desagregação celular, extravasamento do conteúdo citoplasmático resultando na morte celular (GUY, 2003). Dessa forma, a desidratação é um processo essencial na criopreservação que tem como objetivo evitar a formação de cristais de gelo nos tecidos no momento do resfriamento. Por apresentarem altos conteúdos de água, materiais como suspensões celulares, calos, ápices caulinares e embriões somáticos e zigóticos estão sujeitos à formação desses cristais durante o resfriamento (ENGELMANN, 2011).

Outro ponto importante na criopreservação é o descongelamento/reaquecimento. Nessa etapa, semelhante ao que ocorre durante o congelamento/resfriamento, também pode ocorrer a formação de cristais de gelo e, em consequência, as células podem ser danificadas. O descongelamento/reaquecimento rápido por imersão em água ou meio de cultura líquido a 35-40 °C tem garantido bons resultados em muitas espécies (VILLALOBOS, 1991; CARVALHO; VIDAL, 2003, PILATTI, 2011).

Apesar de a criopreservação ser uma técnica desenvolvida e testada em tecidos e células vegetais há mais de 40 anos, a sua prática rotineira é relativamente recente (ENGELMANN, 2004).

A criopreservação pode ser aplicada em diferentes tipos de explantes, como suspensões celulares, calos embriogênicos, embriões zigóticos e somáticos, ápices dentre outros, e para cada tipo é necessário a aplicação de técnicas específicas de criopreservação (ENGELMANN, 2004; SANT et al., 2008). As técnicas de criopreservação desenvolvidas até o momento são: desidratação ao ar, congelamento lento, encapsulamento-desidratação, encapsulamento-vitrificação, pré-cultivo-desidratação, vitrificação, *droplet-freezing* e *droplet vitrification* (SAKAI; ENGELMAN, 2007; REED, 2008;

WANG et al., 2009; KAVIANI, 2011). Em geral, as técnicas clássicas se baseiam na desidratação das células dos explantes pela exposição ao ar, uso de sílica gel ou de crioprotetores (KAVIANI, 2011; ENGELMANN, 2011). As técnicas desenvolvidas mais recentemente baseiam-se principalmente no processo de vitrificação (SANTOS, 2000), que pode ser definida como a passagem da água na fase líquida diretamente para a fase amorfa ou vítrea, evitando assim a formação de cristais de gelo (FAHY et al., 1984; PANIS et al., 2005; SAKAI; ENGELMANN, 2007; ENGELMANN, 2011; BRUNAKOVA et al., 2011).

Para auxiliar na etapa de desidratação ou vitrificação, faz-se uso de substâncias químicas chamadas de crioprotetores que têm como função diminuir o ponto de congelamento e aumentar a estabilidade das membranas (SEIDEL, 1996). Os crioprotetores podem ser classificados como penetrantes ou não penetrantes (SEIDEL, 1996; PANIS et al., 2005). Vários produtos podem ser utilizados com essa finalidade, como o glicerol, glicóis, DMSO (dimetilsulfóxido), sorbitol, açúcares e álcoois-açúcares. O uso dessas substâncias é extremamente importante para o sucesso da criopreservação, porém deve-se levar em consideração a temperatura e o tempo de exposição a essas substâncias, pois as mesmas podem causar toxidez às células (SOUSA, 1990; KAYA et al., 2013).

Várias soluções de vitrificação têm sido desenvolvidas, e a solução *Plant vitrification Solution 2* (PVS2), criada por Sakai et al. (1990), tem sido a mais utilizada atualmente. É composta por 30% de glicerol (p/v), 15% de etileno glicol (p/v) e 15% de DMSO (p/v) em meio de cultura sem regulador de crescimento, além de 0,4M de sacarose e com o pH da solução ajustado em 5,8 (SAKAI et al., 2008).

A técnica de *droplet vitrification* desenvolvida por Panis et al. (2005) é uma adaptação da técnica de vitrificação e é considerada uma das mais recentes

e que vem apresentando resultados bastante promissores. Algumas espécies que foram criopreservadas com sucesso utilizando essa técnica são: batata, alho, banana dentre outras (SAKAI; ENGELMANN, 2007). Embora ainda seja pouco aplicada em espécies nativas do Brasil, alguns resultados positivos já foram relatados na criopreservação de ápices de murici-pequeno (*Birsonyma intermedia*) (SILVA et al., 2013) e mangaba (*Hancornia speciosa*) (SANTOS, 2013).

A aplicação dessa técnica é relativamente simples e consiste basicamente no pré-tratamento dos ápices em meio de cultivo com altas concentrações de sacarose seguido da desidratação pela solução de PVS2. Após a desidratação, os ápices são dispostos em pequenas folhas de papel alumínio com uma gota de PVS2 e imersos em nitrogênio líquido (PANIS et al., 2005; SAKAI; ENGELMANN, 2007). O reaquecimento é realizado em temperatura ambiente com o uso de uma solução de diluição rica em sacarose (ENGELMANN, 2011; CHEN et al., 2011). Após o reaquecimento, os ápices são transferidos para meio específico onde permanecem por três a quatro semanas para retomada do crescimento (PANIS et al., 2005; CHEN et al., 2011).

Apesar de todas as técnicas e protocolos já aplicados com sucesso em diversas espécies, a aplicação da criopreservação em novas espécies depende da otimização de todos os passos envolvidos (DUSSERT; ENGELMANN, NOIROT, 2003).

REFERÊNCIAS

ALICE, C. B. et al. **Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico**. Canoas: ULBRA, 1995. 205 p.

ALMEIDA, L. F. P. **Propagação por enxertia de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) e atemóia (*Annona squamosa* L. x *Annona cherimola* Mill) em diferentes porta-enxertos de Annonaceae**. 2009. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

ALMEIDA, S. P. et al. **Cerrado, espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464 p.

ANDREO, Y.; NAKAGAWA, J.; BARBEDO, C. J. Mobilização de água e conservação da viabilidade de embriões de sementes recalcitrantes de ingá (*Inga vera* Will. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Pennington). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 309-318, mar. 2006.

ASSIS, T. F.; MACHADO, M. A. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 261-296.

BARBEDO, C. J.; BILIA, D. A. C. Evaluation of research on recalcitrant seeds. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, p. 121-125, ago. 1998. Número especial.

BASTOS, L. P. et al. Cultivo *in vitro* de Mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 1122-1124, 2007. Suplemento.

BIAVATTI, M. W.; FARIAS, S. N.; PRADO, S. R. T. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.93, n.3, p.385-389, 2004.

BIST, R. et al. *In vitro* propagation of *Aconitum balfourii* Stapf: a rare medicinal herb of the alpine Himalayas. **Indian Journal of Horticulture**, Lucknow, v. 68, n. 3, p. 394-398, Aug. 2011.

BORGES, S.R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L.S.; LOPES, A.P.; OTONI, W.C.; TAKAHASHI, E.K.; MELO, L.A. Estabelecimento *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 3, p. 605-616, set., 2012.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Bioma Cerrado**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 20 fev. 2014.

BRUNAKOVA, K. et al. Dehydration status of ABA-treated and cold-acclimated *Hypericum perforatum* L. shoot tips subjected to cryopreservation. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 525, n. 1, p. 62-70, 2011.

CARDOSO, C. A. L. et al. Antimicrobial activity of the extracts and fractions of hexanic fruits of *Campomanesia* species (Myrtaceae). **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 13, n. 5, p. 1273-1276, Oct. 2010.

CARVALHO, J.M.F.; VIDAL, M.S. **Crioconservação no melhoramento vegetal**. Brasília: EMBRAPA Algodão, 2003. 22 p. (Documentos, 115).

CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 51-67.

CASTRO, V. S.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 261 p.

CHEN, X. L. et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. **South African Journal of Botany**, Johannesburg, v. 77, n. 2, p. 397-403, Apr. 2011.

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

CRUZ-CRUZ, C.A.; GONZALES-ARNAO, M.T.; ENGELMANN, F. Biotechnology and conservation of plant biodiversity. **Resources**, Washington, v. 2, n. 2, p. 73-95, 2013.

DAUD, N.; TAHA, R. M.; HASBULLAH, N. A. Artificial seed production from encapsulated micro shoots of *Saintpaulia ionantha* Wendl. (African Violet). **Journal of Applied Sciences**, New York, v. 8, n. 24, p. 4662-4667, Dec. 2008.

DE KLERK, G. J. Rooting of microcuttings: theory and practice. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, Gaithersburg, v. 3, n. 8, p. 415-422, 2002.

DE KLERK, G. J.; KRIKEN, W. V. der; JONG, J. C The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. **In Vitro Cellular e Developmental Biology**, Gaithersburg, v. 35, n. 3, p. 189-199, 1999.

DICKEL, M. L.; RATES, S. M. K.; RITTER, M. R. Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 109, n. 1, p. 60-71, Jan. 2007.

DOUSSEAU, S. et al. Ecofisiologia da germinação de sementes de *Campomanesia pubescens*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1362-1368, 2011.

DUARTE, W.F. et al. Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabioba (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 36, n. 4, p. 557-569, 2009.

DUSSERT, S.; ENGELMANN, F.; NOROIT, M. Development of probabilistic tools to assist in the establishment and management of cryopreserved plant germplasm collections. **Cryo-Letter**, London, v. 24, n.3, p. 149-160, May, 2003.

DURIGAN, G.; SIQUEIRA, M. F.; FRANCO, G. A. D. C. Threats to the cerrado remnants of the state of São Paulo, Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, n. 4, p. 355-363, 2007.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cell & Developmental Biology**, Gaithersburg, v. 40, n. 5, p. 427-433, Sept./Oct. 2004.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cell & Developmental Biology**, Gaithersburg, v. 47, n. 1, p. 5-16, Feb. 2011.

FAHY, G. M. et al. Vitriification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, San Diego, v. 21, n. 4, p. 407-426, 1984.

FELFILI, J. M. et al. Potencial econômico da biodiversidade do Cerrado: estágio atual e possibilidades de manejo sustentável dos recursos da flora. In: AGUIAR, L. M. S.; CAMARGO, A. J. A. (Ed.). **Cerrado: ecologia e caracterização**. Brasília: EMBRAPA, 2004. p. 177-220.

FERREIRA, L.C.; GRABE-GUIMARÃES, A.; PAULA, C.A.; MICHEL, M.C.P.; GUIMARÃES, R.G.; REZENDE, S.A.; SOUZA FILHO, J.D.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. **Journal of Ethnopharmacology**, Laussane, v. 145, p. 100-108, 2013.

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

FERREIRA, M. B. Frutos comestíveis nativos do D.F.: gabiobas, pitangas e araçás. **Cerrado**, Brasília, v. 4, n. 18, p. 11-16, 1972.

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

GALHARTE, C. A.; CRESTANA, S. Avaliação do impacto ambiental da integração lavoura-pecuária: aspecto conservação ambiental no cerrado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 11, p. 1202-1209, ago. 2010.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Dordrecht: The Background, 2008. v. 1, 709 p.

GOGOSZ, A. M. et al. Morfoanatomia da plântula de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (Myrtaceae). **Acta Botanica Brasileira**, Porto Alegre, v. 24, n. 3, p. 613-623, 2010.

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

GUY, C. L. Freezing tolerance of plants: current understanding and selected emerging concepts. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 81, n. 12, p. 1216-1223, Dec. 2003.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T. **Plant propagation: principles and practices**. 5th ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1997. 647 p.

HUNG, C. D.; TRUEMAN, S. J. Preservation of encapsulated shoot tips and nodes of the tropical hardwoods *Corymbia torelliana*, *C. citriodora* and *Khaya senegalensis*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 109, n. 2, p. 341-352, May 2012.

IKHLAQ, M. et al. *In vitro* storage of synthetic seeds: effect of different storage conditions and intervals on their conversion ability. **African Journal of Biotechnology**, Johannesburg, v. 9, n. 35, p. 5712-5721, 2010.

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

KLAFKE, J.Z. et al. Antiplatelet, antithrombotic, and fibrinolytic activities of *Campomanesia xanthocarpa*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Thousand Oaks, v. 2012, p.1-9, 2012.

KLAFKE, J. Z. et al. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 127, n. 2, p. 299-305, Feb. 2010.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, Boston, v. 19, n. 3, p. 707-713, June 2005.

LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 582-587, 2009.

MACHADO, R. B. et al. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Available at: <http://www.conservation.org.br/arquivos/RelatDesmatamCerrado.pdf>>. Access in: 20 dez. 2012.

MACHADO, R. B. et al. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro: relatório técnico**. Brasília: Conservação Internacional, 2004. 26 p.

MALDALOSO, R. C. et al. *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. as a gastroprotective agente. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 139, n. 3, p. 772-779, Feb. 2012.

MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H. **Cultura de tecidos de plantas lenhosas**. Santa Maria: UFSM, 1998. 132p.

MARKMAN, B.E.O.; BACCHI, E.M.; KATO, E.T.M. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 94, n. 1, p. 55-57, 2004.

MASUDA, J.; OZAKI, Y.; OKUDO, H. Regulation in rhizome transition to storage organ in lotus (*Nelumbo nucifera* Gertn.) with exogenous gibberellin, gibberellin biosynthesis inhibitors or abscisic acid. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v. 81, n. 1, p. 67-71, 2012.

MELCHIOR, S. J. et al. Colheita e armazenamento de sementes de gabirola (*Campomanesia adamantium* Camb. – Myrtaceae) e implicações na germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 141-150, 2006.

MOREIRA, M. A. et al. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. 'Pérola'. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 875-879, set./out. 2006.

OLIVEIRA, L. J. et al. Características agronômicas e atividade da redutase do nitrato em plantas de *Campomanesia sp.* sob estresse hídrico. **Revista Agrarian**, Dourados, v. 4, n. 11, p.43-53, 2011.

PANIS, B.; SWENNEN, B. P. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant Science**, Shannon, v. 168, n. 1, p. 45-55, Jan. 2005.

PAUNESCU, A. Biotechnology for endangered plant conservation: A critical overview. **Romanian Biotechnological Letters**, Bucharest, v. 14, n. 2, p. 4095-4103, 2009.

PAVAN, F. R. et al. Evaluation of anti-Q Mycobacterium tuberculosis activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 1222-1226, maio 2009.

PEIXOTO, N. et al. Avaliação de crescimento inicial de populações de gabioba em Ipameri. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 1.; JORNADA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO, 3., 2005, Anápolis. **Anais...Anápolis: FAMA**, 2005. 1 CD-ROM.

PILATTI, F. K. et al. *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, Gaithersburg, v. 4, n. 1, p. 82-98, Feb. 2011.

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

PREECE, J. E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulator? **Plant Cell Culture and Biotechnology**, Rehovot, v. 1, n. 1, p.26-37, 1995.

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

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. de. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio cerrado na região do Alto Rio Grande, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 102-123, jan./fev. 2001.

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

SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS2-based vitrification and encapsulation: vitrification protocols. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant cryopreservation: a practical guide**. Corvallis: Springer, 2008. p.33-58.

SANT, R. et al. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 107-111, Jan. 2008.

SANTOS, I. R. I. **Criopreservação de eixos embrionários de espécies de Citrus usando encapsulamento e desidratação**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 23 p. (EMBRAPA-CENARGEN: Documentos, 115).

SANTOS, E.; BETTENCOURT, E. **Manual de apoio à formação e treino em conservação ex situ de recursos fitogenéticos**. Lisboa: Instituto Nacional de Investigação Agrária, 2002. 207 p.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 20, p. 60-65, 2001.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, n. 1, p. 70-94, set. 2000.

SANTOS, M.S. et al. Quantification of the major bioactive phytochemical in the gabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg) juice. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 35, n. 4, p. 783-787, 2013.

SANTOS, P. A. A. **Cultivo e conservação in vitro de *Hancornia speciosa* Gomes**. 2013. 98 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

SARASAN, V. R. et al. Conservation in vitro of threatened plants-progress in the past decade. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant***, Wallingford, v. 42, n. 3, p. 206-214, May/June 2006.

SEIDEL, G. E. J. Cryopreservation of equine embryos. ***Veterinary Clinics of North America: Equine Practice***, Santa Barbara, v. 12, n. 1, p. 85-99, 1996.

SHARMA, S.; SHAHZAD, S.; SILVA, J. A. T. Synseed technology: a complete synthesis. ***Biotechnology Advances***, Waterloo, v. 31, n. 2, p. 186-207, Mar./Apr. 2013.

SILVA, D. B. et al. ***Frutas do Cerrado***. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2001. 178 p.

SILVA, E. P. et al. Caracterização física, química e fisiológica de gabioba (*Campomanesia pubescens*) durante o desenvolvimento. ***Ciência e Tecnologia de Alimentos***, Campinas, v. 29, n. 4, p. 803-809, out./dez. 2009.

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***, London, v. 34, n. 4, p. 338-348, 2013.

SOUSA, V. A. de. Criopreservação de pólen de Eucalyptus spp. ***Boletim de Pesquisa Florestal***, Colombo, n. 21, p. 15-19, 1990.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. ***Botânica sistemática***: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APGILL. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 132 p.

SOUZA, A.V.; BERTONI, B.W.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S. Conservação e enraizamento *in vitro* de infalível (*Mandevilla velutina* K. Schum.), uma planta medicinal do Cerrado. ***Revista Brasileira de Plantas Mediciniais***, Botucatu, v. 13, n. 3, p. 319-327, 2011.

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

VIEIRA, R. F.; MARTINS, V. M. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 3, n. 1, p. 13-36, Sept. 2000.

VILLALOBOS, V. M.; FERREIRA, P.; MORA, A. The use of biotechnology in the conservation of tropical germplasm. **Biotechnology Advances**, New York, v.9, n. 2, p. 197-215, Apr. 1991.

VINAGRE, A. S. et al. Anti-diabetic effects of *Campomanesia xathocarpa* (Berg) leaf decoction. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 46, n. 2, p. 169-177, 2010.

WANG, Q.C. et al. Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 154, n. 3, p. 351-363, June 2009.

CAPÍTULO 2 Micropropagação de gabirobeira (*Campomanesia pubescens*)

RESUMO

Campomanesia pubescens é uma espécie frutífera nativa do Cerrado que além de propriedades comerciais importantes como a boa aceitação dos frutos na alimentação humana, conta com propriedades medicinais consagradas pela medicina popular e com recentes comprovações científicas. A crescente pressão humana nos ecossistemas tem levado a um grave desmatamento de biomas importantes como o Cerrado, causando a perda significativa de diversidade biológica. A cultura de tecidos tem sido empregada com sucesso em diversas espécies do Cerrado no sentido de conservação e mesmo para introduzir a produção em larga escala. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar parâmetros da micropropagação de gabirobeira (*C. pubescens*) como a indução de brotações e o enraizamento. No intuito de induzir brotações, foram testadas diferentes concentrações do fitorregulador BAP (1,1; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 μM), em dois diferentes experimentos, sendo estabelecido como o melhor meio para indução de brotações em *C. pubescens* o meio MS acrescido de 4,4 μM de BAP. Na fase de enraizamento, foi verificada a capacidade de formação de raízes adventícias dessa espécie quando utilizado o fitorregulador AIB em diferentes concentrações (1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 7,5 e 9,0 μM), após dois subcultivos. Porém após oito subcultivos, as brotações não se mostraram responsivas a concentrações semelhantes de AIB e mesmo a outros reguladores. Sugerindo um efeito prejudicial dos subcultivos periódicos no enraizamento *in vitro* de *C. pubescens*. A capacidade de enraizamento foi verificada *ex vitro* com o uso do pó comercial Rootone[®]. Estes resultados são os primeiros relatos a respeito da micropropagação de *C. pubescens*.

Rever resumo – colocar primeiro metodologia e depois resultado

Palavras-chave: Conservação. Cerrado. Frutíferas. Plantas Medicinais. Indução de Brotações.Enraizamento.

ABSTRACT

Campomanesia pubescens is a native fruitful species from Cerrado, that besides commercial properties like edible fruits, presents important medicinal properties, enshrined in folk medicine and recently proven by scientific evidences. The increasing of human pressure on ecosystems has led to severe deforestation of major biomes such as the Cerrado, causing significant loss of biological diversity. Tissue culture has been used successfully in several species from Cerrado towards conservation and even to introduce the large-scale production. In this context, the aim of this work was study some parameters about micropropagation in *C. pubescens* like shoot induction and rooting. In order to induced shoot formation was tested different BA concentrations (1.1; 2.2; 4.4; 6.6 e 8.8 μM μM), in two experiments. The best medium to shoot induction was considered the MS plus 4.4 μM BA. To root induction was verify the root formation capacity when used IBA in different concentrations ((1.5; 3.0; 4.5; 6.0; 7.5 e 9.0 μM) after two subcultures. However, after eight subcultures was not verify the root formation capacity using the similar IBA concentrations earlier applied or even with the use of others growth regulators. Suggesting a detrimental effect of periodic subcultures on in vitro rooting of *C. pubescens*. The ability to ex vitro rooting was observed with the use of commercial Rootone[®] powder. These results are the first reports about micropropagation of *C. pubescens*. Rooting was possible *ex vitro* using the commercial powder Rootone[®].

Keywords: Conservation. Cerrado. Fruitful Plant. Medicinal Plant. Shoot induction. Rooting.

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado é um bioma extremamente rico em biodiversidade e com grande número de espécies endêmicas (KLINK; MACHADO, 2005; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2014). Apesar disso, é considerado um bioma ameaçado e algumas estimativas sugerem que pode desaparecer completamente até 2030 (MACHADO et al., 2012). Esse cenário leva à perda de material genético nativo e muitas vezes de espécies ainda não identificadas ou com características não reconhecidas do ponto de vista científico (MACHADO et al., 2012).

A família Myrtaceae é uma das famílias mais comumente encontradas no Cerrado, sendo o gênero *Campomanesia* um dos mais representativos (OLIVEIRA et al., 2011). Dentre as espécies desse gênero, pode-se citar a *Campomanesia pubescens*, popularmente conhecida como gabirobeira ou gabirobeira de arbusto (SOUZA; LORENZZI, 2008), que produz frutos saborosos muito utilizados na alimentação humana. Além disso, folhas e frutos de espécies desse gênero apresentam importantes propriedades medicinais, como atividade antibiótica e gastroprotetora, também apresentam efeitos no controle da diabetes, no combate ao colesterol e obesidade (MARKMAN, et al., 2004; DICKEL, 2007; PAVAN et al., 2009; VINAGRE et al., 2010; CARDOSO et al., 2010; KLAFKE et al., 2010).

Apesar de todas essas características, a exploração dessas plantas nativas ainda é feita de forma extrativista e a sua conservação é dificultada devido a vários fatores, como por exemplo, a produção de sementes recalcitrantes (DOUSSEAU et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011), o desenvolvimento lento e heterogêneo das plantas em campo (SOUZA; LORENZZI, 2008), a alta predação das mudas e de frutos por animais, a polinização cruzada e a autoincompatibilidade (ALMEIDA et al., 2000). Neste contexto, metodologias

alternativas de propagação assexuada podem auxiliar na disponibilização de produtos vegetais passíveis de serem explorados comercialmente.

A técnica de micropropagação é uma alternativa para a propagação assexuada *in vitro*. A cultura de tecidos tem sido uma importante ferramenta biotecnológica aplicada à conservação e multiplicação de diversas espécies vegetais, pois permite a propagação de espécies com dificuldade de germinação, a produção de mudas em larga escala e em qualquer época do ano, possibilita a formação de bancos de germoplasma e facilita as trocas de materiais livres de contaminantes entre instituições (BASTOS et al., 2007; PINHAL et al., 2011).

A possibilidade de propagação em larga escala de materiais vegetais *in vitro* é possível, pois, os explantes são inoculados em meio de cultura que fornecem todos os nutrientes e fatores de crescimento necessários para a formação e crescimento de órgãos vegetais. Macros e micronutrientes, fonte de carbono principalmente na forma de sacarose, vitaminas e reguladores de crescimento são itens indispensáveis para o cultivo *in vitro* de explantes vegetais, além, é claro, de condições de temperatura e luminosidade adequadas (GEORGE et al., 2008).

Os reguladores de crescimento apresentam atividade biológica igual ou superior ao das substâncias naturais produzidas pelas plantas, de acordo com o balanço entre concentrações endógenas e exógenas, e esse balanço influencia a indução de brotações, o enraizamento, assim como todo o desenvolvimento *in vitro* (BIELACH et al., 2012).

Em plantas nativas do Cerrado, os estudos sobre micropropagação vêm crescendo, mas ainda são muito incipientes, pois a maioria das espécies se encontra em estado selvagem, sendo muitas vezes de difícil estabelecimento *in vitro* (ALMEIDA, 2009; PINHAL et al., 2011). Especificamente para espécies do gênero *Campomanesia*, muitos autores descrevem suas propriedades medicinais e seu potencial de aplicação, entretanto, a micropropagação ainda é

muito pouco investigada (SCUTTI; ZANETTI, 2000, SILVA et al., 2009; KLAFKE et al., 2010; 2012; CHANG et al., 2011; HERZOG et al., 2012; MADALOSSO et al., 2012; SANTOS et al., 2013). Dessa forma, ao se trabalhar com novos genótipos é necessário avaliar a resposta desses materiais ao cultivo *in vitro* e, posteriormente, fazer os ajustes necessários para otimizar o processo de micropropagação (BORGES et al., 2012).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar alguns aspectos a respeito da micropropagação *Campomanesia pubescens*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

O material vegetal foi estabelecido a partir de sementes coletadas na Zona Rural de Lavras, Minas Gerais, em dezembro de 2010 e 2011.

Foi produzida uma exsicata a partir de um indivíduo do local de coleta dos frutos que foi submetida à identificação no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, que confirmou a espécie como *Campomanesia pubescens*.

2.2 Estabelecimento *in vitro*

O processo de estabelecimento *in vitro* foi realizado com base em experimentos realizados anteriormente para espécie da mesma família (dados não mostrados).

Depois da coleta, os frutos foram lavados em água corrente durante 10 minutos, imersão em álcool 70% por 30 segundos foi realizado seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio com 1% de cloro ativo, onde permaneceram por 20 minutos. Após esse período os frutos foram então lavados em água destilada por três vezes antes da retirada das sementes.

As sementes apresentam uma mucilagem fortemente aderida que foi removida por ação mecânica (esfregação) em peneira de nylon sob água corrente. Após a remoção da mucilagem das sementes, a assepsia foi realizada em câmara de fluxo laminar utilizando álcool 70% e hipoclorito de sódio nas mesmas concentrações e tempos de exposição descritos para a assepsia dos frutos.

Após a assepsia, as sementes foram então inoculadas em meio MS (MURASHIG; SKOOG, 1962) com metade das concentrações dos sais e sem

sacarose, 0,7% de ágar e pH ajustado para 5,8. Após a germinação, o material foi mantido em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h e temperatura de 25 ± 2 °C.

2.3 Indução de brotações

Brotações foram excisadas de plantas germinadas *in vitro* e subcultivadas a cada 45 dias em MS suplementado com 2,2 µM de BAP (6-Benzilaminopurina), 0,09 M de sacarose e 0,7% de ágar e pH de 5,8. Após oito ciclos de multiplicação, foi elaborado um experimento para a indução de multibrotações.

Segmentos nodais com cerca de 2 cm de comprimento e contendo um par de gemas axilares foram inoculados em MS com diferentes concentrações de BAP (1,1; 2,2 e 4,4 µM, além da ausência do regulador). Após a inoculação os explantes foram mantidos em sala de crescimento na temperatura de 24 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas. Os parâmetros: número de folhas, sobrevivência dos explantes, altura das brotações, número de brotações e formação de calo na base do explante foram avaliados a cada duas semanas por um período de seis semanas.

Um segundo experimento para indução de multibrotações foi realizado utilizando as mesmas condições descritas no experimento anterior, entretanto com a adição de mais duas concentrações de BAP, 6,6 e 8,8 µM. Para esse experimento não foi avaliado a formação de calos na base dos explantes.

Foram utilizadas 20 repetições para cada tratamento e foi utilizado o meio MS suplementado com 0,09 M de sacarose e 0,3% de Phytigel[®]. O pH foi aferido em $5,8 \pm 0,1$ antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos.

Após o período de avaliações (seis semanas), as brotações foram repicadas e o número de novos explantes obtidos (segmentos contendo um par de gemas) oriundos de cada tratamento também foi avaliado.

2.4 Enraizamento *in vitro*

2.4.1 Enraizamento de brotações após dois subcultivos: efeito do AIB

Brotações de gabirobeira mantidas *in vitro* e com dois subcultivos foram utilizadas como explante para o enraizamento. Foram testadas diferentes concentrações de AIB (1,5; 3; 4,5; 6; 7,5 e 9 μM) e também a ausência desse regulador em meio MS. Todos os meios utilizados foram suplementados com 0,09 M sacarose e 0,7% de ágar, o pH foi ajustado em $5,8 \pm 0,1$ antes da autoclavagem a $121\text{ }^\circ\text{C}$ por 20 minutos. As brotações foram mantidas em sala de crescimento a temperatura de $25 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas por 6 semanas, quando foi avaliado o número de brotações enraizadas.

2.4.2 Enraizamento de brotações após oito subcultivos

2.4.2.1 Efeito do AIB e AIA no enraizamento de brotações

Brotações de gabirobeira mantidas *in vitro* por 30 dias em meio MS na concentração de $4,4\text{ }\mu\text{M}$ de BAP foram transferidas diretamente para meio de enraizamento contendo auxina ou para MS suplementado com 1g L^{-1} de carvão ativado por uma semana antes da transferência para meio de enraizamento.

Foram testadas diferentes concentrações (1, 5, 10 e 20 μM e a ausência do regulador) de AIB (ácido indolbutírico) ou AIA (ácido indolacético). As brotações foram mantidas nas mesmas condições de cultivo citadas anteriormente. Todos os meios utilizados foram autoclavados por 20 minutos a 121 °C e suplementados com 0,09 M de sacarose e 0,3 % de Phytigel®.

2.4.2.2 Efeito do ANA no enraizamento de brotações

Brotações cultivadas em meio MS suplementado com 4,4 μM de BAP foram inoculadas em meio MS suplementado com ANA nas concentrações de 1, 5, 10, 20 e 100 μM e sem a adição do regulador. As brotações foram mantidas nas mesmas condições dos experimentos anteriores e após uma semana, transferidas para meio MS ou WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) livres de auxina. As brotações foram mantidas nessas condições por 6 semanas, sendo as avaliações realizadas a cada 2 semanas.

2.4.2.3 Condições de cultivo durante o enraizamento e avaliações

Em todos os experimentos de enraizamento acima descritos, os meios de cultivo foram suplementados com 0,9 M de sacarose, 0,3 % de Phytigel® e o pH foi aferido em $5,8 \pm 0,1$ antes da autoclavagem a 121°C durante 20 minutos.

Os explantes foram mantidos em sala de crescimento na temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h durante seis semanas, com avaliações a cada duas semanas.

Os parâmetros avaliados foram a porcentagem de brotações enraizadas, o número de folhas e o comprimento da brotação. Foram utilizadas 10 repetições por tratamento.

2.5 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o Inteiramente Casualizado e os dados foram submetidos a ANAVA e as médias analisadas pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Indução de brotações

A utilização de diferentes concentrações de BAP até 4,4 μM foi significativa ($p \leq 0,05$) para a indução de brotações e para o número de folhas, em que as maiores médias foram obtidas na concentração máxima testada (Gráficos 1 e 2).

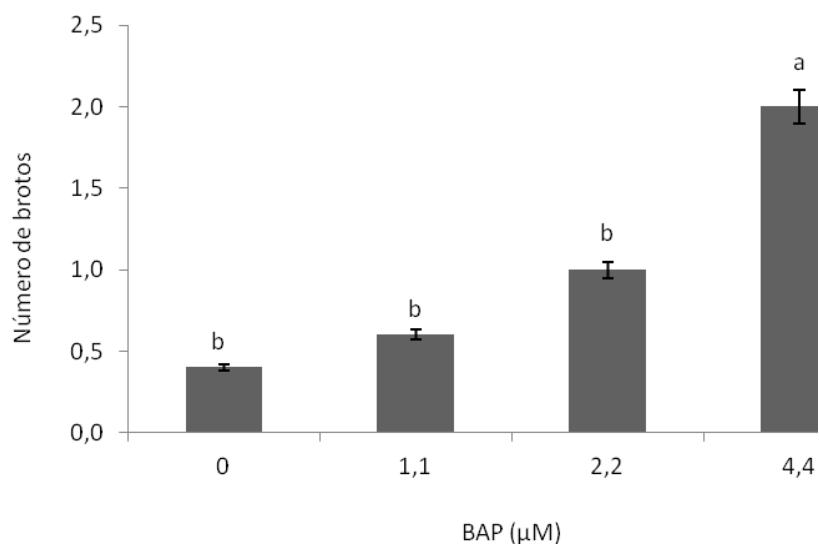


Gráfico 1 Média do número de brotações de gabirobeira em meio MS com diferentes concentrações de BAP após 6 semanas de cultivo *in vitro*. Letras iguais não diferem entre si estatisticamente segundo teste de Scott-Knott com 5 % de significância.

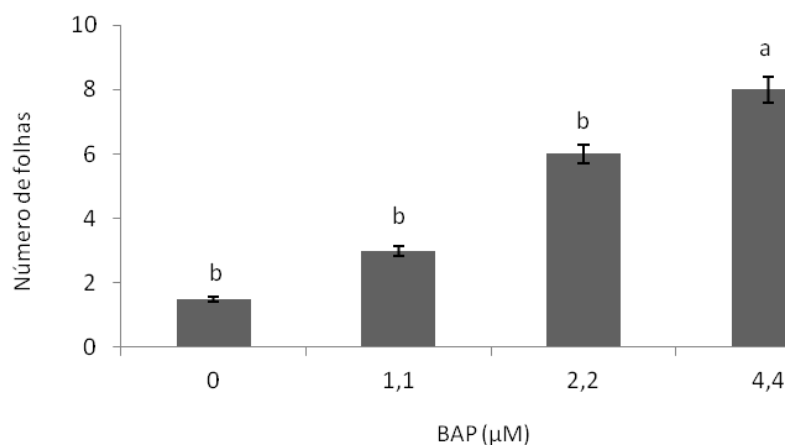


Gráfico 2 Média do número de folhas de gabirobeira em meio MS com diferentes concentrações de BAP após 6 semanas de cultivo *in vitro*. Letras iguais não diferem entre si estatisticamente segundo teste de Scott-Knott com 5 % de significância.

A utilização de concentrações maiores que 4,4 µM de BAP também foi significativa ($p < 0,05$), entretanto, foi observada uma inibição na indução de brotações e na formação de folhas em explantes tratados com 6,6 ou 8,8 µM de BAP, confirmando a concentração de 4,4 µM como melhor concentração para indução de brotações (Gráficos 3 e 4).

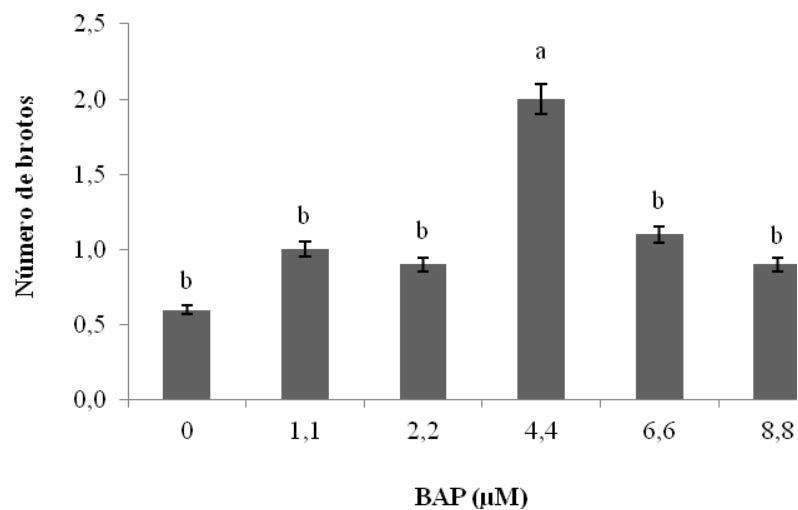


Gráfico 3 Média do n° de brotações de gabirobeira em meio MS com diferentes concentrações de BAP após seis semanas de cultivo *in vitro*. Letras iguais não diferem entre si estatisticamente segundo teste de Scott-Knott com 5 % de significância.

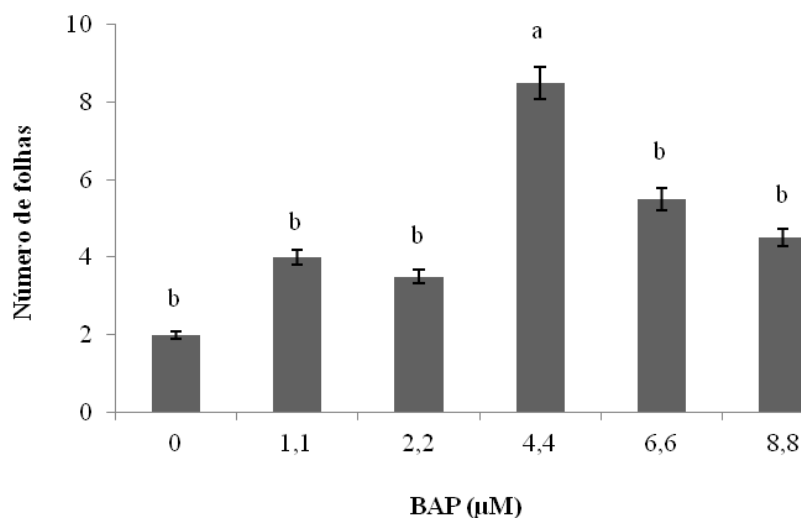


Gráfico 4 Média do n° de folhas de gabirobeira em meio MS com diferentes concentrações de BAP após 6 semanas de cultivo *in vitro*. Letras iguais não diferem entre si estatisticamente segundo teste de Scott-Knott com 5 % de significância.

Concentrações elevadas de citocininas no meio de cultura podem levar a um balanço hormonal desfavorável ao desenvolvimento de brotações *in vitro*, já que esse fator é altamente dependente da relação entre auxinas e citocininas (GEORGE, 2008). Além disso, a exposição a elevadas concentrações de citocininas leva a um aumento na produção de fenóis, o que aumenta a atividade das peroxidases levando a um maior acúmulo de lignina, que pode prejudicar a formação de novos brotos (SCHNABLOVA, 2006).

A sobrevivência média dos explantes após seis semanas foi de 92,5% e a altura média das brotações foi de 4 cm quando cultivadas em meio de indução de brotações com concentrações de BAP até 8,8 μM , ambos os parâmetros não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$).

A porcentagem de explantes com formação de calos na base não foi evidenciada após duas semanas de cultivo, sendo notada apenas após quatro semanas de cultivo, se mantendo constante na 6^o semana, quando foi feita a última avaliação. Não foi verificada a formação de calos apenas na ausência do regulador de crescimento, sendo este tratamento estatisticamente diferente dos demais, a média de brotações tratadas com BAP com calos na base foi de 89,2% (Gráfico 5).

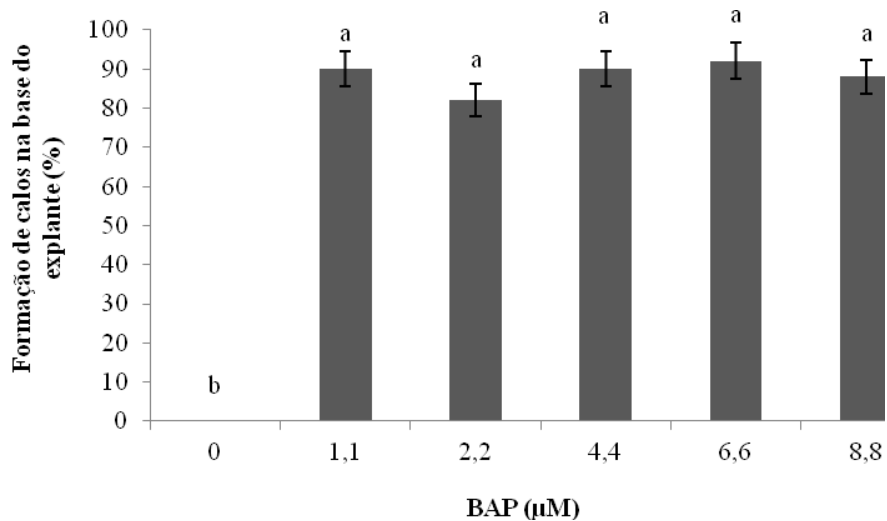


Gráfico 5 Porcentagem de explantes com formação de calo na base após 6 semanas de cultivo. Letras iguais não diferem entre si estatisticamente segundo teste de Scott-Knott com 5 % de significância.

O número de segmentos caulinares contendo um par de gemas axilares que puderam ser extraídos das brotações tratadas com BAP até 8,8 µM apresentou diferenças estatísticas ($p < 0,05$). As brotações tratadas com 4,4 µM de BAP produziram o maior número de explantes passíveis de serem utilizados para novos ciclos de multiplicação (Gráfico 6), mostrando uma relação direta entre o número de brotos desenvolvidos e o número de gemas presentes.

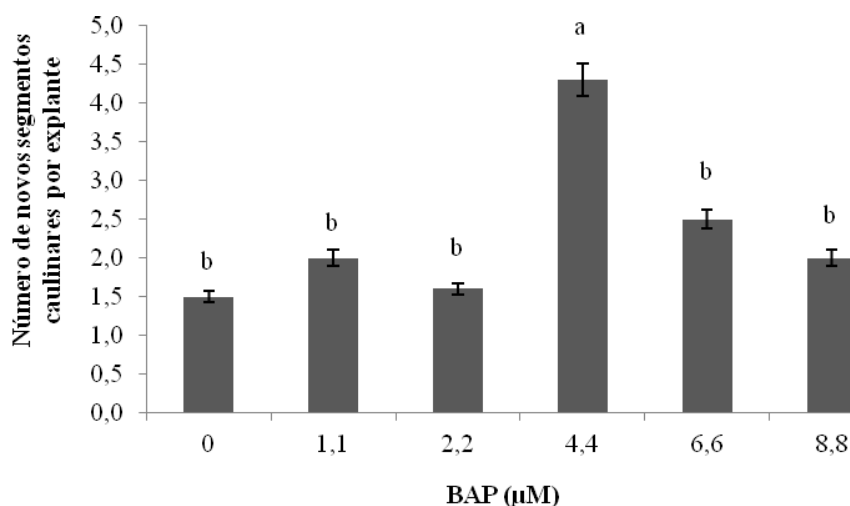


Gráfico 6 Média do número de segmentos caulinares contendo um par de gemasgerado por broto em cada tratamento após seis semanas de cultivo em meio com diferentes concentrações de BAP. Letras iguais não diferem entre si estatisticamente segundo teste de Scott-Knott com 5 % de significância.

O BAP é a citocinina mais comumente utilizada na fase de multiplicação da micropropagação (ARAGÃO et al., 2011; BIST et al., 2011; BANERJEE et al., 2010) e tem sido aplicada com sucesso em diversas espécies, inclusive em espécies lenhosas como o pau-brasil e o eucalipto (DUTRA et al., 2009; ARAGÃO et al., 2011), entretanto, a concentração ótima pode variar dependendo da espécie objeto de estudo. Scutti & Zanetti (2000) relatam que o maior comprimento de brotações durante a micropropagação de *C. xanthocarpa*, uma espécie de gabirobeira nativa encontrada nos mesmos locais de ocorrência de *C. pubescens*, ocorreu na ausência de reguladores de crescimento e que o maior número de brotações foi obtido na presença de 2,2 µM de BAP, ou seja, utilizando a metade da concentração da mesma citocinina que gerou melhores resultados neste trabalho.

De acordo com Grattapaglia & Machado (1998), a diminuição no número brotos a partir de determinada concentração de BAP pode ser causada por um efeito citotóxico da citocinina ou por uma alteração hormonal. O eucalipto (*Eucalyptus* spp), uma das espécies mais importantes comercialmente e mais estudadas da família Myrtaceae, tem mostrado bons resultados na propagação clonal via micropropagação utilizando o BAP como a principal citocinina para indução de brotações em concentrações que variam de 0,06 μM a 8,8 μM (DUTRA et al., 2009; BORGES et al., 2012, NAVROSKI, et al., 2013) e o meio MS como meio de cultura tem sido o mais utilizado (DUTRA et al., 2009; BORGES et al., 2012).

Baixas concentrações de auxinas, geralmente combinadas com concentrações mais elevadas de citocininas, podem ser benéficas na indução de brotações por estimular ainda mais as divisões celulares (CHENG et al., 2013). Por exemplo, em *Syzygium francisci*, uma espécie da família Myrtaceae, a adição de 0,5 μM de AIB no meio de cultura em conjunto com 4,5 μM de BAP proporcionou o maior número de brotos (SHATNAWI et al., 2004). Da mesma forma, a multiplicação de *Eucalyptus dunnii* MAIDEN é realizada com o uso de 0,5 mg L^{-1} de AIB e 0,1 mg L^{-1} de BAP (NAVROSKI et al., 2013). Entretanto, auxinas também estão muito relacionadas com o aumento na formação de calos exatamente pelo estímulo das divisões celulares (GEORGE et al., 2008). Conforme observado no Gráfico 5, a adição de apenas 1,1 μM de BAP já foi suficiente para promover a formação de calos na base em 90% das brotações. Esta observação foi suficiente para rejeitar a interação entre BAP e uma auxina para a indução de brotações em *C. pubescens*.

3.2 Enraizamento

3.2.1 Efeito do AIB no enraizamento de brotações após dois subcultivos

Após 6 semanas em sala de crescimento, foi verificada presença de raízes em todos os tratamentos, com exceção do tratamento com ausência do regulador AIB. Os tratamentos com 4,5 e 6 μM de AIB mostraram maior média de enraizamento, 53 e 33 % respectivamente e foram estatisticamente diferentes dos demais ($p < 0,05$) (Gráfico 7).

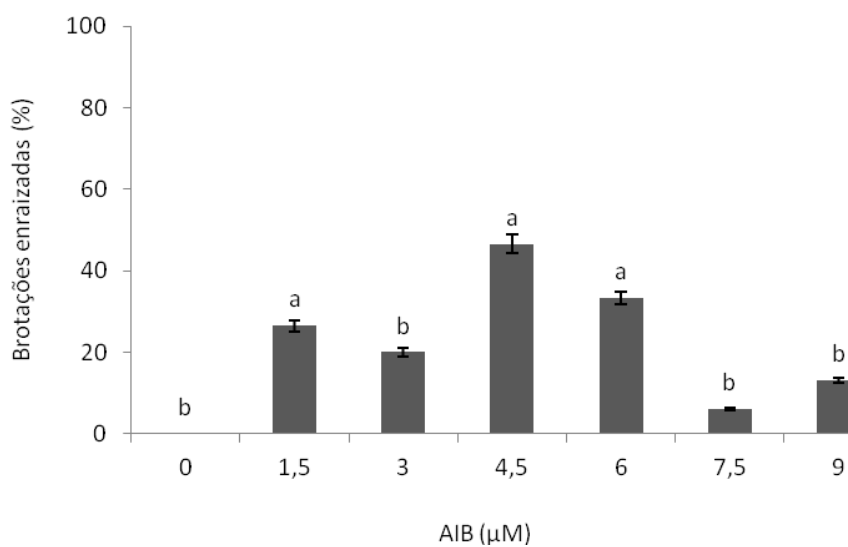


Gráfico 7 Porcentagem do número de raízes de gabirobeira em meio MS com diferentes concentrações de AIB após 6 semanas de cultivo. Letras iguais não diferem entre si estatisticamente segundo teste de Scott-Knott com 5 % de significância.

O AIB tem sido a auxina mais comumente utilizada e com sucesso no enraizamento *in vitro* de diferentes espécies, inclusive para espécies de eucalipto (DUTRA et al., 2009; BORGES et al., 2012). Scutti & Zanetti (2000) obtiveram raízes em *C. xanthocarpa* em meio MS sem adição de fitorreguladores, o que contrasta com o resultado obtido neste trabalho, onde apenas no meio MS sem regulador não foram obtidas raízes apesar de serem da mesma família e gênero. Essa diferença no comportamento *in vitro* pode ser explicada pela diferença nos genótipos, ou mesmo pelas condições das culturas, como o número de subcultivos.

3.2.2 Efeito do AIB, AIA e carvão ativado no enraizamento

A espécie *C. pubescens* mostrou-se recalcitrante para o enraizamento *in vitro* com ausência de formação de raízes adventícias após oito subcultivos, independentemente dos fitorreguladores analisados ou da presença de carvão ativado. Para todos os outros parâmetros avaliados (altura da planta, número de brotos e número de folhas) também não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$).

Diante da dificuldade de enraizamento *in vitro* apresentado pela espécie após sucessivos subcultivos, foi montado um teste com apenas seis brotações em substrato comercial e com o uso do pó para o enraizamento de estacas Rootone[®] que apresenta uma alta concentração de AIB (3.000 ppm). A parte basal foi tratada com o pó e, em seguida, as brotações foram acondicionadas em frascos contendo vermiculita (Figura 1).



Figura 1 Teste para o enraizamento utilizando o pó comercial Rootone®
Nota: Barra = 0,5 cm

Após 45 dias de cultivo, foi constatado o enraizamento em 66% das brotações submetidas ao tratamento (Figura 2). Embora esse teste não se configure um experimento passível de ser analisado estatisticamente, a indução do enraizamento adventício neste sistema aponta uma direção para a obtenção do processo de enraizamento antes da fase de aclimatização, o que permitiria a formação de um protocolo completo de micropropagação de *C. pubescens*. Além disso, o enraizamento realizado diretamente *ex vitro* pode ser mais econômico ao excluir uma fase da micropropagação *in vitro*.



Figura 2 Enraizamento de gabirobeira com a utilização de Rootone®
Barra = 0,5 cm

Há pesquisas indicando que o número de subcultivos de materiais vegetais *in vitro* afeta diretamente a capacidade de enraizamento de brotações (HOU et al., 2010). Embora a maioria dos trabalhos relatem o incremento do enraizamento com o aumento de subcultivos (PEI et al., 2002; WANG; GUO, 2007; HOU et al., 2010), os resultados obtidos em *C. pubescens* mostram que o número de subcultivos influencia negativamente no enraizamento *in vitro* desta espécie. A experiência prática com micropropagação de diversas espécies do Cerrado tem mostrado a influência negativa do aumento do número de subcultivos, não só para o enraizamento, como também para a multiplicação *in vitro*. Essa constatação pode ser explicada pelo fato de que explantes juvenis respondem melhor a estímulos hormonais *in vitro* do que explantes mais maduros ou envelhecidos (PIERIK et al., 1997; SCHOTTZ et al., 2007). Além disso, subcultivos podem aumentar a produção de compostos fenólicos, especialmente em espécies lenhosas, o que dificulta a manutenção *in vitro*. (GEORGE, 2008).

A dificuldade de enraizamento, a pouca quantidade de raízes formadas ou a baixa funcionalidade das mesmas é o maior obstáculo a ser superado na aplicação da micropropagação (DeKLERKE, 2002). Essa dificuldade deve-se, em parte, aos diversos fatores externos e internos que regulam esse processo e que ainda não estão completamente elucidados, dificultando assim o controle ou indução do enraizamento (SOUZA; PEREIRA, 2007; SAINI et al., 2013), além disso, alguns genótipos se mostram recalcitrantes quanto a esse fator (SAINI et al., 2013). Em um estudo sobre a micropropagação de infalível (*Mandevilla velutina*), também uma espécie do Cerrado, Souza et al. (2011) não conseguiram obter raízes *in vitro* com o uso de diferentes concentrações de AIB ou ANA, assim como algumas espécies de eucalipto como *Eucalyptus globulus* são, reconhecidamente, recalcitrantes ao enraizamento (BORGES et al., 2012) da mesma forma que *C. pubescens* se mostrou após sucessivos subcultivos.

Atualmente é aceito cientificamente que o enraizamento *in vitro* consiste de três fases: indução, iniciação e expressão. A presença de auxinas é necessária para a fase de indução, mas é inibitória nas outras duas fases (DeKLERKE, 2002). Porém, em *Syzygium francissi*, (cravo da Índia) o enraizamento foi obtido com as brotações em contato com auxinas por seis semanas (SHATNAWI et al., 2004). A longa exposição das brotações a citocininas também pode inibir o enraizamento nas três fases descritas acima (DeKLERK, 2002). O carvão ativado pode ser utilizado para eliminar possíveis efeitos residuais de reguladores, especialmente das citocininas que possam inibir o enraizamento, além de adsorver diversas outras substâncias do meio de cultura como compostos fenólicos que prejudicam o enraizamento (THOMAS, 2008), mas em *C. pubescens*, a adição de carvão ativado não mostrou nenhum efeito para o enraizamento *in vitro*.

Concentrações endógenas de auxinas também influenciam no enraizamento *in vitro* (SOUZA; PEREIRA, 2007). Ford et al. (2002) mostraram que em alguns casos, quando há a adição de auxina exógena, ocorre o aumento nos níveis endógenos de AIA que decresce antes da formação das raízes o que dificulta ou mesmo impede o enraizamento. Além disso, as células presentes na base das microestacas usadas como explantes podem se tornar menos sensíveis ao efeito das auxinas ou menos competentes para diferenciação em raízes (FORD et al., 2002; SOUZA & PEREIRA, 2007).

4 CONCLUSÕES

O meio mais indicado para indução de brotações em *C. pubescens* é o MS suplementado com 4,4 µM de BAP, por promover o maior número de brotos e também de folhas.

O enraizamento dessa espécie parece ser influenciado pelo número de subcultivos, sendo possível uma porcentagem de mais de 50% de enraizamento quando este é realizado até o segundo subcultivo. Após 8 subcultivos, o enraizamento foi possível apenas *ex vitro* com a utilização de pó contendo alta concentração de AIB (3000 ppm).

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L. F. P. **Propagação por enxertia de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) e atemóia (*Annona squamosa* L. x *Annona cherimola* Mill) em diferentes porta-enxertos de Annonaceae.** 2009. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

ALMEIDA, M.J.O.F.; NAVES, R.V.; XIMENES, P.A. Influência das abelhas (*Apis mellifera*) na polinização da gabioba (*Campomanesia* spp.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 30, n. 2, p. 25-28, jul./dez. 2000.

ARAGÃO, A.K.O.; ALOUFA, M.A.I.; COSTA, I.D. Effect of BAP (6-benzilaminopurine) on shoot induction in explants of brazilwood. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 3, p. 339-345, jul./set. 2010.

BANERJEE, S. et al. Regeneration of phytoplasma-free *Artemisia roxburghiana* Besser var. *purpurascens* (Jacq.) Hook. plants using apical meristem culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 103, n. 2, p.189-196, 2010.

BASTOS, L. P. et al. Cultivo *in vitro* de Mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 1122-1124, 2007. Suplemento.

BIELACH, A. et al. Genetic approach towards the identification of auxin-cytokinin crosstalk components involved in root development. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 367, n. 1595, p. 1469-1478, June 2012.

BIST, R. et al. *In vitro* propagation of *Aconitum balfourii* Stapf: a rare medicinal herb of the alpine Himalayas. **Indian Journal of Horticulture**, Lucknow, v. 68, n. 3, p. 394-398, Aug. 2011.

BORGES, S.R. et al. Estabelecimento *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 3, p. 605-616, set. 2012.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Bioma Cerrado**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 20 fev. 2014.

CARDOSO, C. A. L. et al. Antimicrobial activity of the extracts and fractions of hexanic fruits of *Campomanesia* species (Myrtaceae). **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 13, n. 5, p. 1273-1276, Oct. 2010.

CHANG, R. et al. Essential oil composition and antioxidante and antimicrobial properties of *Campomanesia pubescens* O. Berg, native of Brazilian Cerrado. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 30, n. 9, p. 1843-1848, 2011.

CHENG, Z.J. et al. Patterno f auxin and cytokinin responses for shoot meristema induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR 3. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 161, n. 1, p. 240-251, Jan. 2013.

DE KLERK, G. J. Rooting of microcutiings: theory and practice. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, Gaithersburg, v. 3, n. 8, p. 415-422, 2002.

DICKEL, M. L.; RATES, S. M. K.; RITTER, M. R. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 109, n. 1, p. 60-71, Jan. 2007.

DOUSSEAU, S. et al. Ecofisiologia da germinação de sementes de *Campomanesia pubescens*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1362-1368, 2011.

DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação de Eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 1, n. 58, p. 49-59, jan/jun, 2009.

FORD, Y.Y. et al. Adventitious rooting: examining the role of auxin in easy and a difficult-to-root plant. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.36, n. 2, p.149-159, 2002.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Dordrecht: The Background, 2008. v. 1, 709 p.

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

HERZOG, N.F.M.; MALAVASI, M.M.; MALAVASI, U.C. Morfometria dos frutos e germinação de sementes de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 4, p. 1359-1366, 2012.

HOU, J. W.; GUO, S. J.; WANG, G. Y. Effects of *in vitro* subculture on the physiological characteristics of adventitious root formation in microshoots of *Castanea mollissima* cv. "yanshanhong". **Journal of Forestry Research**, Tokyo, v. 21, n. 2, p. 155-160, June 2010.

KLAFKE, J. Z. et al. Antiplatelet, antithrombotic and fibrinolytic activities of *Campomanesia xanthocarpa*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Thousand Oaks, v. 2012, p. 1-8, 2012.

KLAFKE, J. Z. et al. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 127, n. 2, p. 299-305, Feb. 2010.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, Boston, v. 19, n. 3, p. 707-713, June 2005.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416, May/June 1980.

MACHADO, R. B. et al. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**. Disponível em: <<http://www.conservation.org.br/arquivos/RelatDesmatamCerrado.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2012.

MADALOSSO, R.C. et al. *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. as gastroprotective agente. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 139, n. 3, p. 772-779, 2012.

MARKMAN, B.E.O.; BACCHI, E.M.; KATO, E.T.M. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 94, n. 1, p. 55-57, 2004.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.

NAVROSKI, M.C. et al. Alongamento *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Cerne**, Lavras, v. 19, n. 4, p. 545-550, dez. 2013.

OLIVEIRA, L. J. et al. Características agronômicas e atividade da redutase do nitrato em plantas de *Campomanesia* sp. sob estresse hídrico. **Revista Agrarian**, Dourados, v. 4, n. 11, p. 43-53, 2011.

PAVAN, F. R. et al. Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 1222-1226, maio 2009.

PEI, D. et al. Shoot rooting *in vitro* for walnut cultivars. **Scientia Silvae Sincae**, Beijing, v. 38, n. 2, p. 32-38, Apr. 2002.

PIERIK, R.L.M.; OOSTERKAMP, J.; EBBING, M.A.C. Factors controlling adventitious root formation of explants from juvenile and adult *Quercus robur* 'Fastigiata'. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.71, n. 1/2, p.87-92, Nov. 1997.

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

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

SANTOS, M. S. et al. Quantification of the major bioactive phytochemical in the gabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg) juice. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 35, n. 4, p. 783-787, 2013.

SCHNABLOVA, R. et al. Transgenic ipt tobacco overproducing cytokinins overaccumulates phenolic compounds during *in vitro* growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, Philadelphia, v. 44, n. 10, p. 526-534, 2006.

SCHOTTZ, E. S. et al. *In vitro* multiplication of *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae) from juvenile shoots. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 2, p. 109-117, abr./jun. 2007.

SCUTTI, M. B.; ZANETTE, F. Propagação vegetativa da guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* berg.) *in vitro* e por estaquia. **Scientia Agraria**, Piracicaba, v. 1, n. 1/2, p. 75-82, 2000.

SHATNAWI, M.A.; JOHNSON, K.A.; TORPY, F.R. *In vitro* propagation and cryostorage of *Syzygium francisi* (Myrtaceae) by the encapsulation-dehydration method. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Wallingford, v. 40, n. 4, p. 403-407, 2004.

SILVA, E. P. et al. Caracterização física, química e fisiológica de gabirolba (*Campomanesia pubescens*) durante o desenvolvimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 803-809, out./dez. 2009.

SOUZA, A.V. et al. Conservação e enraizamento *in vitro* de infalível (*Mandevilla velutina* K. Schum.), uma planta medicinal do Cerrado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 3, p. 319-327, 2011.

SOUZA, A.V.; PEREIRA, A.M.S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n.4, p. 103-117, set. 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APGILL. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 132 p.

THOMAS, T.D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, n. 6, p. 618-631, Nov./Dec. 2008.

VINAGRE, A. S. et al. Anti-diabetic effects of *Campomanesia xathocarpa* (Berg) leaf decoction. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 46, n. 2, p. 169-177, 2010.

WANG, G.; GUO, S. The key fator of tip culture of *Castanea molissima* cv. Yanshanhong. **Journal of South China Agricultural Univeristy**, Beijing, v. 28, n. 1, p. 144-147, 2007. Supplement.

CAPÍTULO 3 Influência do tipo de explante e constituição da cápsula na produção e armazenamento de unidades encapsuláveis de gabirobeira (*Campomanesia pubescens*)

RESUMO

O encapsulamento em matriz de alginato é uma técnica simples, barata e eficiente de preservação de germoplasma, sendo especialmente empregada em espécies que produzem sementes não viáveis, recalcitrantes ou com dificuldade de propagação ou conservação. Várias espécies vegetais de importância econômica são encontradas no Cerrado, como por exemplo, a gabirobeira (*Campomanesia pubescens*), que além de frutífera, apresenta também importantes propriedades medicinais. Porém a espécie possui sementes recalcitrantes inviabilizando o armazenamento e conservação por métodos convencionais. Os objetivos deste trabalho foram: estabelecer um protocolo para produção de unidades encapsuláveis de gabirobeira, testando diferentes explantes e constituições para a matriz de alginato e avaliar o efeito de diferentes períodos de armazenamento (1, 7, 15 e 30 dias) dessas cápsulas em refrigerador a 4°C. Foram testados dois meios para a constituição da cápsula (MS e água destilada) e dois tipos de explante (ápices caulinares e gemas axilares). A constituição do meio apresentou influência apenas para o tipo de explante gemas axilares. A taxa de rompimento das cápsulas contendo ápices caulinares foi de 100% enquanto que cápsulas contendo gemas axilares apresentaram rompimento inferior a 8%. O armazenamento de ápices caulinares a 4°C foi possível por apenas sete dias sem o comprometimento da taxa de rompimento das cápsulas, o que pode ser utilizado para facilitar o transporte de material genético entre diferentes instituições de pesquisa.

Palavras-chave: Sementes recalcitrantes. *Myrtaceae*. Cerrado. Conservação *in vitro*.

ABSTRACT

The sodium alginate encapsulation is a simple, cheap and efficient technique for preservation of germplasm, and is employed especially in species that produce non-viable seeds or hard of propagating and preserving seeds. Many plant species of economic importance are found in the Cerrado, especially species such as gabirobeira (*Campomanesia pubescens*), which in addition to be fruitful, it also presents important medicinal properties. But as this specie presents recalcitrant seeds, its storage and conservation by conventional methods is impracticable. The objectives of this study were: establish a protocol for producing encapsulated units of gabirobeira, testing different explants and constitutions for the alginate matrix, and evaluate the effect of different storage periods (1, 7, 15 and 30 days) of these capsules in a refrigerator at 4°C. The capsules were performed using the MS culture media or distilled water and two types of explants (apical and axillary buds) were also tested. Differences regarding the medium constitution were only observed when the axillary buds were used as an explant. The rate of rupture of the capsules containing shoot tips was 100% while capsules containing axillary buds was only 8%. The storage shoot apices at 4°C was possible only by seven days without compromising the rate of rupture of the capsules.

Keywords: Recalcitrant Seed. *Myrtaceae*. Cerrado. *In vitro* Conservation.

1 INTRODUÇÃO

A técnica de encapsulamento de diferentes tipos de explantes, como embriões somáticos, ápices caulinares e gemas laterais em uma matriz de alginato é uma alternativa simples, barata e eficiente de preservação de germoplasma (HUNG; TRUEMAN, 2012; MISHRA et al., 2011), sendo especialmente empregada em espécies que produzem sementes não viáveis ou que apresentem alguma dificuldade de propagação e conservação, como no caso das sementes recalcitrantes (DAUD; TAHA; HASBULLAH, 2008). Além da conservação genética, a produção de unidades encapsuláveis permite a troca de germoplasmas de forma segura e eficiente (GERMANA et al., 2011; HUNG; TRUEMAN, 2012).

As unidades encapsuláveis são, na grande maioria dos trabalhos, produzidas em uma matriz de alginato, pois esse componente apresenta diversas facilidades de aplicação, como a boa solubilidade em temperatura ambiente, boa propriedade geleificante, baixo custo, fácil manipulação além de não apresentar efeito tóxico nem para as plantas nem para o homem (PEREIRA et al., 2008). Porém, apesar de já terem sido obtidos diversos resultados promissores da aplicação dessa técnica (BUSTAN et al., 2013; HUNG; TRUEMAN, 2012; RIHAN et al., 2012), o tipo de explante e os constituintes das cápsulas ainda carecem de investigação (GUEDES; COSTA; PEREIRA, 2007; PEREIRA et al., 2008) pois, as necessidades de nutrientes, compostos orgânicos e inorgânicos são espécie-específico requerendo estudos direcionados para a espécie de interesse (SHARMA; SHAHZAD; SILVA, 2013; SUNDARARAJ; AGRAWAL; TYAGI, 2010). Com relação a espécies nativas do Cerrado brasileiro, os estudos sobre a produção e o armazenamento de unidades encapsuláveis ainda são bastante incipientes.

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, atrás apenas da Amazônia, ocupando cerca de um quarto de todo território nacional (KLINK; MACHADO, 2005). Possui grande diversidade de flora com um elevado grau de endemismo. Apesar da importância do Cerrado para a manutenção da biodiversidade vegetal, calcula-se que aproximadamente 55% da área original já sofreu com o desmatamento predatório (MACHADO et al., 2004; SANTOS, 2001), havendo risco do seu completo desaparecimento até 2030 (MACHADO et al., 2012).

Dentre as diversas espécies presentes no Cerrado que possuem potencial comercial para a exploração de frutos, além de propriedades medicinais, pode-se citar a gabirobeira (*Campomanesia pubescens*), que é uma espécie arbustiva da família *Myrtaceae*, podendo ser encontrada desde o estado de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul (ALICE et al., 1995).

As propriedades medicinais do chá das folhas e cascas de caule de gabirobeira são utilizadas popularmente no combate a afecções do aparelho urinário e contra diarreia devido à ação adstringente (FERREIRA, 1972; RODRIGUES; CARVALHO, 2001). Estudos mostram que o uso contínuo do chá das folhas de gabirobeira contribui para a redução da massa corporal (BIAVATTI; FARIAS; PRADO, 2004) e na região sul do Brasil, o chá é utilizado para reduzir a obesidade (DICKEL; RATES; RITTER, 2007).

Recentemente tem sido estudada a ação do extrato das folhas da gabirobeira no controle da diabetes e como antibiótico (CARDOSO et al., 2010; VINAGRE et al., 2010). Pavan et al. (2009) também demonstraram que o acetato de etila, extraído dos frutos da gabirobeira, apresenta atividade contra o patógeno causador da tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*). Há pesquisas também mostrando a redução do nível de colesterol do sangue em pacientes afetados pela hipercolesterolemia (KLAFKE et al., 2010).

Apesar do potencial para a exploração econômica da gabirobeira devido as suas propriedades medicinais comprovadas e do fato de que a espécie produz sementes recalcitrantes, impedindo o armazenamento e consequentemente a conservação pelos métodos convencionais (DOSSEAU et al., 2011), a conservação do germoplasma de gabirobeira não tem recebido a devida atenção.

Diante da importância de conservação da biodiversidade vegetal do Cerrado, e nesse caso especificamente da gabirobeira (*Campomanesia pubescens*), o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para a produção e armazenamento de unidades encapsuláveis de gabirobeira.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Sementes de gabirobeira (*Campomanesia pubescens*) coletadas de populações nativas foram germinadas *in vitro* e utilizadas para a multiplicação de plantas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 2,2 μ M de BAP (6-benzilaminopurina), 3% (p/v) de sacarose e 0,7% (p/v) de ágar com pH ajustado em 5,8. As plantas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2 °C e utilizados como fonte de explantes. Em câmara de fluxo laminar, ápices caulinares e gemas laterais com aproximadamente 0,5 cm foram excisados com o auxílio de pinças e bisturis em um microscópio estereoscópico e utilizados como explantes para o encapsulamento.

2.2 Produção de unidades encapsuláveis

Foram testados, como meio para diluição da matriz de alginato (2,5%), água destilada e meio de cultura MS sem adição de cálcio. Os explantes excisados (segmentos contendo ápices ou gemas laterais) foram então misturados às diferentes matrizes de alginato e, com o auxílio de pipetas automáticas, cada explante foi resgatado numa alíquota de 500 μ L e gotejado um a um em solução com cloreto de cálcio (100 mM) para complexação da cápsula durante 20 minutos.

Após período de complexação, as cápsulas formadas foram então mergulhadas em água estéril para remoção do excesso de cloreto de cálcio e, em seguida, mergulhadas em solução de nitrato de potássio (100 mM) para descomplexação durante 15 minutos. Após esse processo, as unidades

encapsuláveis foram inoculadas uma a uma em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio para germinação constituído de MS suplementado com 0,09 M de sacarose, 0,7% de ágar e 2,2 μ M de BAP e pH de 5,8. Os tubos de ensaio foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 30 dias. A taxa de germinação (rompimento da cápsula) foi avaliada aos 15 e 30 dias após a inoculação. Cada tratamento (solução de diluição da matriz de alginato x tipo de explante) continha 12 repetições, cada tubo contendo uma cápsula considerada como uma repetição.

O delineamento experimental utilizado foi o DIC (Delineamento Inteiramente Casualizado) em esquema fatorial (2×2) e as médias de ruptura da cápsula foram avaliadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade no *software* Sisvar (FERREIRA, 2011).

2.3 Armazenamento à baixa temperatura

Para testar o armazenamento das unidades encapsuláveis de *Campomanesia pubescens*, as cápsulas foram produzidas utilizando o mesmo protocolo citado anteriormente, porém usando apenas meio de cultura MS sem adição de cálcio para diluição da matriz de alginato e ápices caulinares como explantes. Cada explante foi resgatado em 500 μ L da matriz de alginato e complexado durante 20 minutos em cloreto de cálcio (100 mM). Imediatamente após a complexação, as cápsulas foram lavadas em água estéril para remoção do excesso de cloreto de cálcio e acondicionadas em placas de Petri previamente esterilizadas. As placas contendo as cápsulas foram então armazenadas e mantidas em refrigerador na temperatura de 4°C por diferentes períodos (1, 7, 15 e 30 dias).

Para o tratamento controle, as cápsulas não armazenadas a 4°C passaram por todo o processo, incluindo a descomplexação, foram inoculadas uma a uma

em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS suplementado com 2,2 μ M de BAP, 0,09 M de sacarose e 0,7% de ágar e mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Após cada período de armazenamento, as cápsulas foram retiradas do refrigerador e submetidas ao processo de descomplexação. Em seguida, foram inoculadas no mesmo meio do tratamento controle e mantidas sob as mesmas condições de cultivo. Após 30 dias da inoculação, foi avaliada a taxa de germinação (rompimento da cápsula). Cada tratamento foi composto por 12 repetições em que cada tubo com uma cápsula foi considerado como uma repetição.

Para estudar o armazenamento das unidades encapsuláveis, o delineamento experimental foi o DIC e as médias de ruptura da cápsula foram avaliadas pelo teste de Tukey com 5% de significância no *software* Sisvar (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Unidades encapsuláveis

A utilização de ápices caulinares como explantes para a produção das unidades encapsuláveis, independente dos meios utilizados para diluição da matriz de alginato (água destilada ou meio MS), permitiu uma taxa de rompimento de 100% das cápsulas contendo o meio MS e 91,7% das cápsulas contendo água como meio de diluição, sendo essa diferença significativa estatisticamente após 15 dias do encapsulamento ($p < 0,05$) (Gráfico 1). Em contraste, os tratamentos que utilizaram gemas laterais como explantes não apresentaram o rompimento da cápsula após 15 dias do encapsulamento.

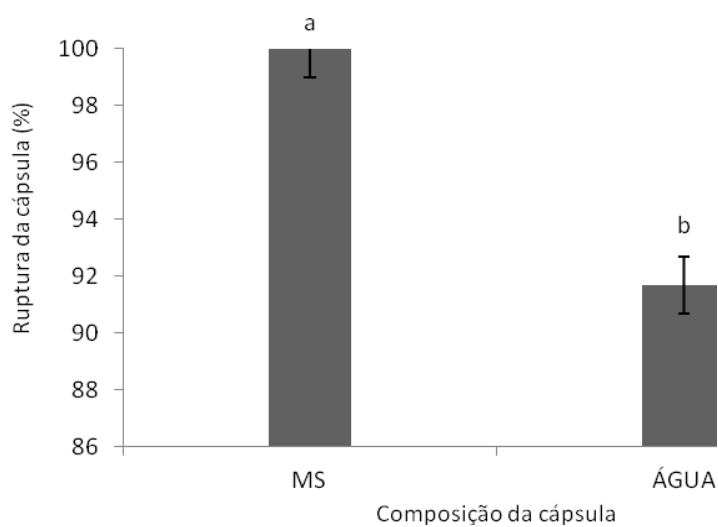


Gráfico 1 Taxa de ruptura de cápsulas de alginato compostas de meio MS ou apenas água contendo como explantes ápices caulinares, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade

Após 30 dias do encapsulamento das gemas laterais, a taxa de germinação das cápsulas contendo água destilada ou meio MS foi de 8,4% e 16,7%, respectivamente, sendo que essa diferença é estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Gráfico 2). Quando foram utilizadas gemas apicais como explantes, a taxa de germinação permaneceu a mesma após 30 dias do encapsulamento, porém as brotações já mostravam desenvolvimento avançado, apresentando primórdios foliares desenvolvidos (dados não mostrados).

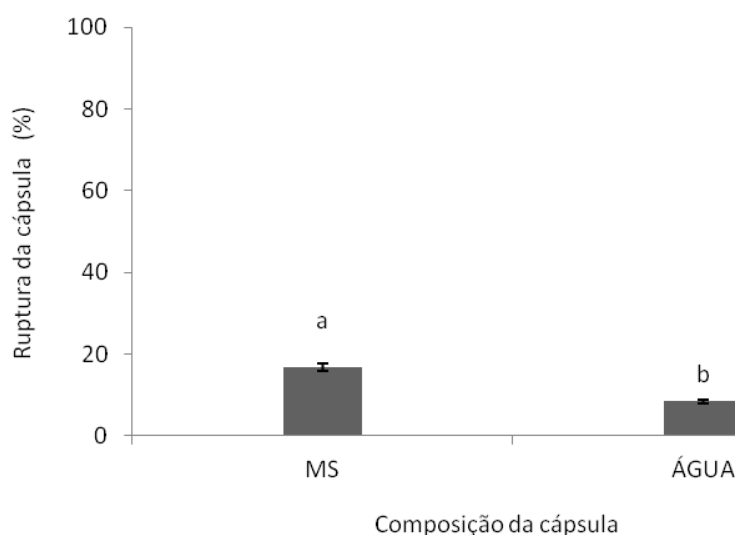


Gráfico 2 Taxa de ruptura de cápsulas de alginato constituídas de água destilada ou meio MS e contendo gemas axilares de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade

Os primeiros estudos com unidades encapsuláveis utilizaram embriões somáticos como fonte de explantes, porém a dificuldade de obtenção desse tipo de material em algumas espécies levou ao uso de outros explantes, como gemas laterais e apicais (PATTNAIK; CHAND, 2000). Atualmente esses são os tipos

de explantes mais utilizados para a produção de unidades encapsuláveis devido a sua facilidade de obtenção e do menor risco de variação somaclonal, muito comum em culturas embriogênicas (ARA; JAISWAL; JAISWAL, 2000; SHARMA; SHAHZAD; SILVA, 2013; STANDARDI; PICCIONI, 1998;). É comum ápices caulinares apresentarem melhores resultados, já que normalmente gemas axilares possuem certo grau natural de dormência devido a dominância exercida pelos ápices (SHARMA; SHAHZAD; SILVA, 2013).

A qualidade das cápsulas e o desenvolvimento dos explantes dependem, primeiramente, da constituição da própria cápsula que por sua vez está relacionada com a quantidade e disponibilidade de nutrientes, do tipo de explante utilizado e, eventualmente, da quantidade e tipo de reguladores de crescimento adicionados (SENARATNA; MCKERSIE; BOWLEY, 1992; SHARMA; SHAHZAD; SILVA, 2013). Para a maioria das espécies já estudadas, a adição de nutrientes presentes no meio MS é altamente recomendada, porém, algumas espécies de *Meliaceae* mostraram melhor taxa de ruptura das cápsulas quando essas foram produzidas sem a adição de açúcar ou nutrientes (SHARMA; SHAHZAD; SILVA, 2013). Para mangabeira, foi obtido 90% de sobrevivência com a utilização do meio WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) na constituição da cápsula e ápices caulinares como explantes (NOGUEIRA, 2010).

3.2 Encapsulamento e armazenamento

O tratamento controle (cápsulas não armazenadas a 4°C) apresentou uma taxa de 95% de rompimento das unidades encapsuláveis. Para os demais tratamentos, foi observado um decréscimo acentuado na porcentagem de rompimento das cápsulas, com 70% de rompimento após 7 dias, chegando à

ausência de rompimento após 15 dias de armazenamento a 4°C ($p < 0,05$)(Gráfico 3).

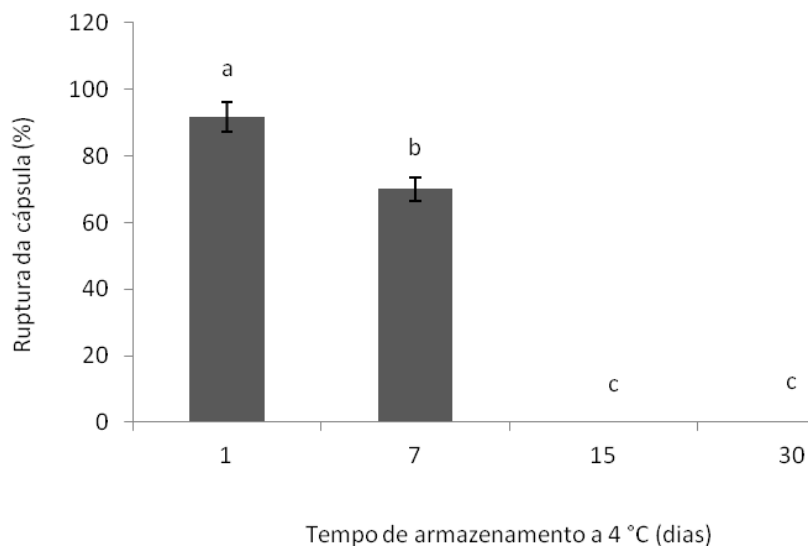


Gráfico 3 Taxa de ruptura da cápsula em função do tempo de armazenamento a 4°C.

As condições mais utilizadas e que apresentam melhores resultados para a conservação de plantas *in vitro* em médio prazo (por até 10 meses) são: baixa luminosidade e baixas temperaturas, porém, algumas particularidades podem explicar a baixa eficiência no armazenamento de unidades encapsuláveis. O alginato ao ser polimerizado com o cloreto de cálcio, embora exerça uma proteção sobre o explante, pode sofrer uma forte e rápida desidratação ao entrar em contato com o ar, tornando a cápsula endurecida e dificultando, ou mesmo impedindo, o desenvolvimento dos explantes e conseqüentemente o rompimento da cápsula (LAMBARDI; BENELLI; OZUDOGRU, 2006). Além disso, a desidratação da cápsula limita a respiração do material vegetal levando a uma rápida perda da viabilidade germinativa (REDENBAUGH; FUJII; SLADE, 1993). Todas essas dificuldades tendem a aumentar com o tempo de

armazenamento (LAMBARDI; BENELLI; OZUDOGRU, 2006) como confirmado nos resultados obtidos no presente trabalho.

Outro fator importante que influencia o armazenamento é a temperatura podendo variar para cada espécie (AHMAD; ANIS, 2010; TABASSUM et al., 2010). Para algumas culturas tropicais e subtropicais, altas temperaturas, chegando algumas vezes a 25°C, podem ser mais eficientes que baixas temperaturas para o armazenamento e desenvolvimento dos explantes, entretanto, o período de armazenamento é drasticamente reduzido (SUNDARARAJ; AGRAWAL; TYAGI, 2010). O armazenamento de unidades encapsuláveis de espécies da família *Meliaceae* e *Myrtaceae* foi mais eficiente na faixa de temperatura de 10–14°C do que a 4°C, entretanto, as cápsulas foram armazenadas em placas contendo meio de cultura (HUNG; TRUEMAN, 2012) diferentemente do que foi feito neste presente trabalho. Assim como os resultados para *C. pubescens*, Nogueira (2010), conseguiu armazenar unidades encapsuláveis de mangabeira a 4 °C por um curto período de tempo.

Apesar do curto período de armazenamento das cápsulas obtido neste trabalho (sete dias), o armazenamento diretamente em placa de Petri sem adição de nenhum meio de cultura ou agente osmótico facilita e barateia o transporte e a troca de material genético entre diferentes instituições de pesquisas.

4 CONCLUSÕES

É possível realizar a produção de unidades encapsuláveis de gabirobeira utilizando MS na constituição da cápsula e ápices caulinares como explantes.

O armazenamento das unidades encapsuláveis é possível por até sete dias em refrigerador a 4°C, o que facilita e barateia o transporte e troca de germoplasma entre diferentes instituições de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, N.; ANIS, M. Direct plant regeneration from encapsulated nodal segments of *Vitex negundo*. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 54, n. 4, p. 748-752, Dec. 2010.
- ALICE, C. B. et al. **Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico**. Canoas: ULBRA, 1995. 205 p.
- ARA, H.; JAISWAL, U.; JAISWAL, V.S. Synthetic seed: prospects and limitations. **CurrentScience**, Bangalore, v. 78, n. 12, p. 1438-1444, 2000.
- BIAVATTI, M. W.; FARIAS, S. N.; PRADO, S. R. T. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenesis* (Jacq.) J. F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 93, n. 3, p. 385-389, 2004.
- BUSTAM, S. et al. Selection of optimal stage for protocorm-like bodies and production of artificial seeds for direct regeneration on different media and short term storage of *Dendrobium Shavin White*. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 69, n. 3, p. 215-224, Apr. 2013.
- CARDOSO, C. A. L. et al. Antimicrobial activity of the extracts and fractions of hexanic fruits of *Campomanesia* species (Myrtaceae). **Journal of Medicinal Food**, New Rochele, v. 13, n. 5, p. 1273-1276, Oct. 2010.
- DAUD, N.; TAHA, R.M.; HASBULLAH, N.A. Artificial seed production from encapsulated micro shoots of *Saintpaulia ionantha Wendl.* (African Violet). **Journal of Applied Sciences**, New York, v. 8, n. 24, p. 4662-4667, Dec. 2008.
- DICKEL, M. L.; RATES, S. M. K.; RITTER, M. R. Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 109, n. 1, p. 60-71, Jan. 2007.

DOUSSEAU, S. et al. Ecofisiologia da germinação de sementes de *Campomanesia pubescens*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1362-1368, 2011.

FERREIRA, D. F. Sisvar a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FERREIRA, M. B. Frutos comestíveis nativos do D.F.: gabiobas, pitangas e araçás. **Cerrado**, Brasília, v. 4, n. 18, p. 11-16, 1972.

GERMANA, M.A. et al. Organogenesis and encapsulation of *in vitro*-derived propagules of Carrizo citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osb. 9 *Poncirus trifoliata* (L.) Raf]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 106, n. 2, p. 299-307, Feb. 2011.

GUEDES, R.S.; COSTA, F.H.S.; PEREIRA, J.E.S. Características físicas e nutricionais da matriz de encapsulamento na produção de sementes sintéticas de pimenta-longa (*Piper hispidinervum* C. DC.). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v.31, n. 6, p. 1005-1011, nov./dez. 2007.

HUNG, C.D.; TRUEMAN, S.J. Preservation of encapsulated shoot tips and nodes of the tropical hardwoods *Corymbia torelliana*, *C. citriodora* and *Khaya senegalensis*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 109, n. 2, p. 341-352, May 2012.

KLAFKE, J. Z. et al. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 127, n. 2, p. 299-305, Feb. 2010.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, Boston, v. 19, n. 3, p. 707-713, June 2005.

LAMBARDI, M.; BENELLI, C.; OZUDOGRU, E.A. Synthetic seed technology in ornamental plants. In: SILVA, J. A. T. da (Ed.). **Floriculture, ornamental and plant biotechnology**. London: Global Science Books, 2006. v. 2, p. 347-354.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416, May/June 1980.

MACHADO, R. B. et al. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**. Disponível em: <<http://www.conservation.org.br/arquivos/RelatDesmatamCerrado.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2012.

MACHADO, R. B. et al. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**: relatório técnico. Brasília: Conservação Internacional, 2004. 26 p.

MISHRA, J. et al. Assessment of genetic fidelity of encapsulated microshoots of *Picrorhiza kurrooa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 104, n. 2, p. 181-186, Feb. 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.

NOGUEIRA, G. F. **Criopreservação e produção de sementes sintéticas *in vitro* de mangabeira**. 2010. 72 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

PATTNAIK, S.; CHAND, P.K. Morphogenic response of the alginate encapsulated axillary buds from *in vitro* shoot cultures of six mulberries. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 60, n. 3, p. 177-185, Apr. 2000.

PAVAN, F. R. et al. Evaluation of anti-QMycobacterium tuberculosis activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 1222-1226, maio 2009.

PEREIRA, J.E.S. et al. Composição da matriz de encapsulamento na formação e conversão de sementes sintéticas de pimenta-longa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.26, n. 1, p. 93-96, jan./mar. 2008.

REDENBAUGH, K.; FUJII, J.A.A.; SLADE, D. Hydrated coatings for synthetic seeds. In: REDENBAUGH, K. (Ed.). **Synseeds: application of synthetic seeds to crop improvement**. Boca Raton: CRC, 1993. p. 35-46.

RIHAN, H.Z. et al. Encapsulation of cauliflower (*Brassica oleracea* var botrytis) microshoots as artificial seeds and their conversion and growth in commercial substrates. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 107, n. 2, p. 243-225, Nov. 2011.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. de. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio cerrado na região do Alto Rio Grande, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 102-123, jan./fev. 2001.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 20, p.60-65, maio/jun. 2001.

SENARATNA, T.; MCKERSIE, B.D.; BOWLEY, S.R. Artificial seeds of alfafa (*Medicago sativa* L.): induction of desiccation tolerance in somatic embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Dordrecht, v. 26, n. 1, p. 85-90, Jan. 1990.

SHARMA, S.; SHAHZAD, S.; SILVA, J.A.T. Synseed technology: a complete synthesis. **Biotechnology Advances**, Waterloo, v. 31, n. 2, p. 186-207, Mar./Apr. 2013.

STANDARDI, A.; PICCIONI, E. Recent perspectives on synthetic seed technology using nonembryogenic *in vitro*-derived explants. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 159, n. 6, p. 68-78, Nov. 1998.

SUNDARARAJ, S.G.; AGRAWAL, A.; TYAGI, R.K. Encapsulation for in vitro short-term storage and exchange of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) germplasm. **Scientia Horticulturae**, Mission, v. 125, n. 4, p. 761-766, 2010.

TABASSUM, B. et al. Viability assessment of *in vitro* produced synthetic seeds of cucumber. **African Journal of Biotechnology**, Bowie, v. 9, n. 42, p. 7026-7032, Oct. 2010.

VINAGRE, A. S. et al. Anti-diabetic effects of *Campomanesia xathocarpa* (Berg) leaf decoction. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 46, n. 2, p. 169-177, 2010.

CAPÍTULO 4 Criopreservação de ápices caulinares de gabirobeira via *droplet vitrification*

RESUMO

A criopreservação, armazenamento de material biológico em ultrabaixa temperatura, é uma ferramenta poderosa e que vem sendo aplicada com sucesso na conservação da biodiversidade vegetal, especialmente em espécies que só se propagam vegetativamente ou que possuem sementes recalcitrantes. Dentre as técnicas de criopreservação, tem-se destacado a *droplet-vitrification* em que os explantes são colocados diretamente em contato com o nitrogênio líquido envolto em apenas uma gota do crioprotetor, o que garante taxas ultrarrápidas de resfriamento e reaquecimento. *Campomanesia pubescens* é uma espécie nativa do Cerrado que produz sementes recalcitrantes, sendo por esse motivo de difícil armazenamento. Nesse caso, a aplicação da criopreservação, especificamente da *droplet vitrification*, é vista como uma maneira eficaz de preservação. Para aplicação da *droplet-vitrification* em gabirobeira, foram avaliados o crescimento de ápices caulinares e gemas axilares com tamanho de aproximadamente 1mm em meio para regeneração com diferentes concentrações de BAP (2,2; 4,4; 6,6 ou sem o fitorregulador). O efeito do pré-cultivo em meio rico em sacarose e o tempo de exposição ao crioprotetor PVS2 também foram investigados. A criopreservação foi feita com a imersão direta dos explantes em nitrogênio líquido com uma gota de PVS2 e a retomada do crescimento também foi avaliada. Ápices caulinares regeneraram mais eficientemente que gemas axilares, e não houve diferença na utilização de meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP. O pré-cultivo mostrou ser essencial à sobrevivência dos explantes submetidos à solução de vitrificação PVS2, independente do tempo de exposição a essa solução. O tempo de exposição ao PVS2 de 45 minutos prejudica a sobrevivência e desenvolvimento dos ápices. A utilização de PVS2 por 15 ou 30 minutos foi eficiente na criopreservação de ápices caulinares de gabirobeira, proporcionando uma sobrevivência de mais de 50% após a criopreservação.

Palavras-chave: *Campomanesia pubescens*. Cerrado. Frutíferas. Plantas Medicinais. Vitrificação. PVS2.

ABSTRACT

Cryopreservation, the storage of biological materials at ultra-low temperature, is a powerful tool that has been successfully applied in the conservation of plant biodiversity, especially in species with vegetative propagation or producing recalcitrant seeds. Among the cryopreservation techniques highlights the droplet-vitrification where the explants are placed directly in contact with the liquid nitrogen wrapped in just a drop of cryoprotectant, which ensures ultra-fast cooling and rewarming rates. *Campomanesia pubescens* is native Cerrado producing recalcitrant seeds, therefore, are difficult to store. In this case, the application of cryopreservation, specifically the droplet-vitrification is seen as an effective way of preservation. For the application of droplet vitrification in gabirobeira were evaluated the growth of shoot tips and axillary buds with about 1mm in size medium for regeneration with different concentrations of BAP (2.2, 4.4, 6.6 or without growth regulator). The effect of pre-culture in medium rich in sucrose and exposure time to cryoprotectant PVS2 were also investigated. Cryopreservation was performed by direct immersion of explants in liquid nitrogen with a drop of PVS2 and resumption of growth was also evaluated. Shoot tips were more efficiently regenerated compared to axillary buds, and no difference was observed in the use of MS supplemented with different BA concentrations. The preculture was shown to be essential for the explants survival undergoing vitrification solution PVS2 independent of the exposure time in that solution. The exposure time to 45 minutes in PVS2 was detrimental to the survival and development of the shoot tips. The use of PVS2 for 15 or 30 minutes was effective in cryopreservation gabirobeira shoot tips, providing a survival rate higher than 50% after cryopreservation.

Keywords: *Campomanesia pubescens*. Cerrado. Fruitful Plants. Medicinal Plants. Vitrification. PVS2

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos grandes centros de diversidade biológica, apresentando cerca de 20% da biodiversidade mundial (PILATTI et al., 2011). O Cerrado é o segundo maior bioma do país, apresentando uma grande diversidade vegetal, sendo que grande parte das espécies são consideradas endêmicas (KLINK; MACHADO, 2005). Muitas dessas espécies apresentam potencial para serem exploradas comercialmente seja para alimentação, ornamentação ou para a exploração de suas propriedades medicinais. Além disso, é possível que ainda haja espécies não identificadas e/ou com poucos estudos (PILATTI et al., 2011). Apesar de ser tão importante para a diversidade vegetal, o Cerrado vem sofrendo com o desmatamento e é considerado um bioma em risco (FELFILI et al., 2004; PILATTI et al., 2011).

Dentre as muitas espécies importantes encontradas no Cerrado, pode-se citar a *Campomanesia pubescens*, ou gabirobeira como é popularmente conhecida (OLIVEIRA et al., 2011; SOUZA; LORENZI, 2005). Espécies desse gênero, pertencente à família Myrtaceae, apresentam além de potencial para exploração comercial de frutos, importantes propriedades medicinais, muitas já consagradas pelo uso popular e com recentes comprovações científicas (CARDOSO et al., 2010; DICKEL; RATES; RITTER, 2007; KLAFKE et al., 2010, 2012; MELCHIOR et al., 2006; PAVAN et al., 2009; SANTOS et al., 2013; VINAGRE et al., 2010). A *Campomanesia pubescens* possui sementes recalcitrantes (DOUSSEAU et al., 2011) ou seja, não suportam dessecação e baixas temperaturas de armazenamento, o que impede a sua conservação por metodologias convencionalmente empregadas na conservação de sementes (DOUSSEAU et al., 2011; MASETTO et al., 2008).

Um método efetivo para conservação da biodiversidade, especialmente para espécies que se propagam vegetativamente ou que produzem sementes

recalcitrantes, é a criopreservação (ENGELMANN, 2011), que pode ser definida como o armazenamento de material biológico em temperaturas ultrabaixas em nitrogênio líquido (-196 °C) ou em sua fase de vapor (-150 °C) (KHARTA, 1985).

Dentre as diversas técnicas usadas na criopreservação, a *droplet vitrification*, desenvolvida por Panis et al. (2005), é uma promissora e poderosa ferramenta para preservação de explantes vegetais como ápices caulinares e axilares. A grande vantagem dessa técnica são as taxas ultra rápidas de resfriamento e reaquecimento, que podem ser alcançadas graças ao volume diminuto de crioprotetor utilizado e ao uso de folhas de alumínio (KAYA et al., 2013). Embora já seja usada rotineiramente e com sucesso em algumas espécies como a banana, para espécies da flora brasileira existem poucos estudos sobre criopreservação, em especial utilizando a técnica da *droplet vitrification* (SANTOS, 2013; SILVA et al., 2013).

Diante da importância de conservação da biodiversidade do Cerrado, neste caso, em especial da gabirobeira, o objetivo deste trabalho foi preservar ápices caulinares de gabirobeira utilizando a *droplet vitrification*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Em câmara de fluxo laminar e com auxílio de bisturi e microscópio estereoscópico binocular, ápices caulinares e gemas axilares com tamanho de 1 mm (Figura 1) foram excisados de brotações de gabirobeira cultivadas *in vitro* em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 4,4 μ M de 6-benzilaminopurina (BAP) e 0,09 M de sacarose, foram utilizados para os teste de regeneração.

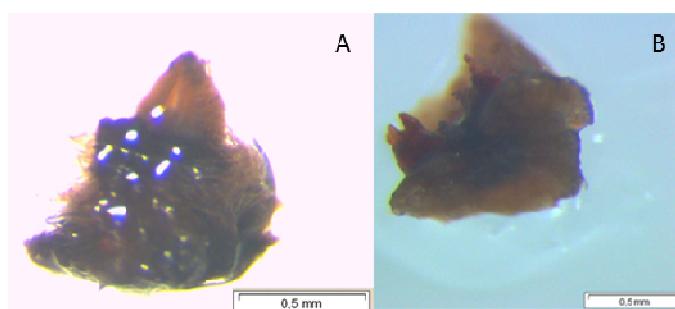


Figura 1 Ápices caulinares (A) e gemas axilares (B) de *C. pubescens*

2.2 Meio de regeneração de ápices caulinares e gemas axilares

Para a regeneração de ápices caulinares e gemas laterais, foram testadas, com base nos resultados obtidos no capítulo 2, as concentrações de 2,2; 4,4 e 6,6 μ M de BAP, além da ausência do regulador em meio MS suplementado com 0,09 M sacarose, 0,3% de Phytigel[®] e 50 ppm de ácido ascórbico. O pH do meio foi aferido em $5,8 \pm 0,1$ antes da autoclavagem a 121 °C por 20 minutos. Foram utilizados 30 explantes por tratamento, divididos em três replicatas. Os explantes

foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C no escuro por uma semana antes da transferência para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2 °C. Os meristemas permaneceram sob as mesmas condições mencionadas por 30 dias, quando foi avaliada a taxa de sobrevivência dos explantes.

2.3 Efeito do pré-cultivo e do tempo de exposição ao PVS2

Para investigar o efeito do pré-cultivo, ápices caulinares foram pré-cultivados ou não durante 24 horas no escuro, antes do tratamento com a solução de vitrificação de plantas número 2 (PVS2) desenvolvida por Sakai, Kobayashi e Oiyama (1990). O meio de pré-cultivo era composto dos sais e vitaminas do meio MS acrescido de 50 ppm de ácido ascórbico, 0,3% Phytigel[®], 0,3 M de sacarose e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Os explantes não pré-cultivados foram mantidos em meio semelhante, mas com a concentração padrão de sacarose (0,09 M) até o final do processo de excisão dos ápices.

Os ápices, pré-cultivados ou não, foram imersos em solução de carregamento (0,4M de sacarose e 2 M de glicerol dissolvidos em meio MS) por 20 minutos a 25 °C antes da imersão por diferentes tempos (15, 30 e 45 minutos) em PVS2 (30% glicerol, 15% etileno glicol, 15% DMSO e 0,4 M de sacarose dissolvidos em meio MS) a 0 °C. O tratamento controle consistiu da não imersão em PVS2.

Após cada período de tratamento em PVS2, os explantes foram então submetidos a 15 minutos em solução de descarregamento a 25 °C composta por 1,2 M de sacarose dissolvido em meio MS. Todas as soluções acima descritas tiveram o pH ajustado em 5,8 antes da filtroesterelização. Após os tratamentos com as soluções crioprotetoras, os ápices foram colocados sobre disco de papel filtro esterelizado em meio de pós-cultivo (idêntico ao meio de pré-cultivo). Os

ápices utilizados como controle passaram diretamente da solução de carregamento para a solução de descarregamento.

Decorrido o tempo de 24 h, os ápices caulinares foram então transferidos para MS acrescido de 50 ppm de ácido ascórbico, 0,3% Phytigel[®], 0,09 M de sacarose e suplementado com o fitorregulador BAP na concentração de 2,2 ou 4,4 μM e com pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2 °C no escuro por mais sete dias antes da transferência para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas.

A avaliação foi feita após 30 dias, quando foi observada a porcentagem de sobrevivência dos explantes. Para cada tratamento, foram feitas três repetições com cinco replicatas cada.

2.4 Criopreservação, reaquecimento e retomada do crescimento

A criopreservação dos ápices caulinares foi realizada utilizando a técnica *droplet vitrification* desenvolvida por Panis et al. (2005).

Após 24h de pré-cultivo em meio MS suplementado com 0,3 M de sacarose, os ápices foram imersos em solução de carregamento em temperatura ambiente por 20 minutos e transferidos para PVS2 a 0 °C por 15, 30 e 45 minutos. Após cada tempo de exposição ao PVS2, os ápices foram acomodados juntamente uma gota de PVS2 em pequenas folhas de alumínio (0,5 x 2,0 cm) e imersos em nitrogênio líquido. Os explantes foram mantidos a -196 °C por 24 horas e então imediatamente submetidos a reaquecimento em solução de descarregamento em temperatura ambiente por 15 minutos.

Depois do reaquecimento, os ápices foram colocados sobre um disco de papel filtro em meio de pós-cultivo (MS + 0,3 M de sacarose) em placa de Petri[®] (92 x 16 mm), onde permaneceram por 24 h em sala de crescimento escura antes da transferência para meio MS suplementado com 4,4 μM de BAP. Os explantes

foram mantidos em sala de crescimento no escuro por mais seis dias e, após esse período, os explantes foram então transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Após 30 dias da criopreservação foram avaliadas a porcentagem de sobrevivência dos ápices e o desenvolvimento dos primórdios foliares.

A criopreservação foi realizada em triplicata em que, para cada tempo de exposição ao PVS2 foram 10 ápices caulinares, sendo três como controle e sete criopreservados.

2.5 Análises estatísticas

Os dados referentes ao teste de toxicidade, pré-cultivo e criopreservação foram transformados pelo arcoseno ($y' = \text{arcoseno } y^{1/2}$, onde y = porcentagem original/100). Para o experimento de regeneração não foi feita nenhuma transformação e assim como os demais dados foram submetidos a ANAVA e as médias comparadas segundo teste de Scott-Knott com 5% de significância

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Regeneração de ápices caulinares e gemas axilares

A taxa de sobrevivência dos explantes apicais e axilares foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$), sendo que os explantes apicais mostraram taxa de sobrevivência superior às gemas axilares independente do meio de crescimento utilizado. A interação concentrações de BAP x tipo de explante não foi significativa ($p > 0,05$). Dentre as diferentes concentrações de BAP testadas para os ápices caulinares, as concentrações de 2,2 e 4,4 μM de BAP proporcionaram a maior taxa de crescimento, de 70 e 80% respectivamente (Gráfico 1). Na comparação entre as diferentes concentrações de BAP com gemas axilares como explante, apenas a concentração de 6,6 μM foi significativamente diferente dos demais tratamentos ($p < 0,05$).

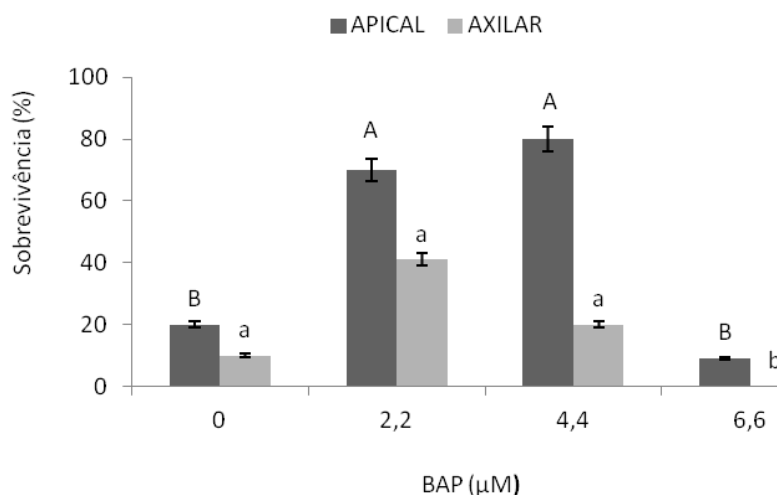


Gráfico 1 Explantes apicais e axilares de *C. pubescens* em meio MS com diferentes concentrações de BAP após 30 dias de cultivo. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si segundo teste de Scott-knott com 5% de significância dentro do explante apical. Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre dentro do explante lateral.

Embora o uso de gemas axilares na criopreservação seja desejável por proporcionar maior número de explantes, o uso de ápices caulinares é mais comumente encontrado na literatura (PANIS; SWENNEN, 2005; SILVA et al., 2013). Silva et al. (2013) relataram maior taxa de sobrevivência e também desenvolvimento mais acelerado de ápices caulinares em comparação a gemas axilares. Ápices caulinares correspondem ao local de maior produção de auxinas, o que promove a dominância apical, resultando em um menor desenvolvimento das gemas laterais (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008).

Mesmo com a excisão das gemas laterais, as mesmas provavelmente ainda estavam sob influência dessa dominância, necessitando de adaptações no meio de cultura para otimizar o crescimento deste tipo de explante.

3.2 Pré-cultivo e exposição ao PVS2

O pré-cultivo em meio rico em sacarose (0,3 M) por 24 horas aumentou significativamente ($p < 0,05$) a sobrevivência em todos os tempos de PVS2 testados independentemente da concentração de BAP utilizada no meio de crescimento (Gráfico 2).

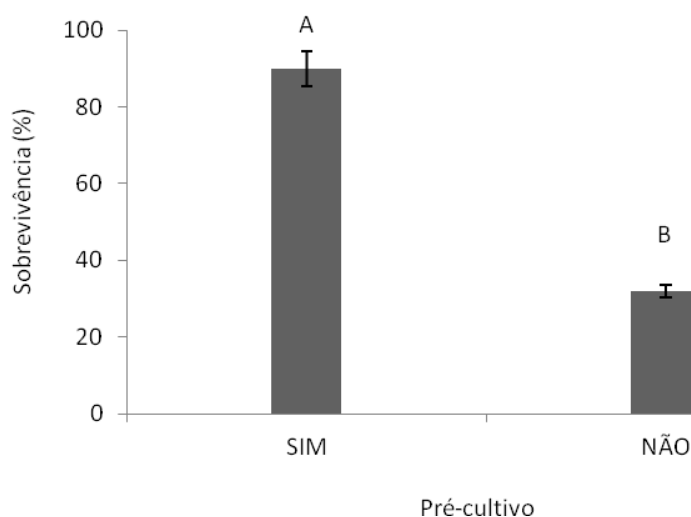


Gráfico 2 Efeito do pré-cultivo na sobrevivência de ápices caulinares de *C. pubescens* após 30 dias de cultivo. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si, segundo teste de Scott-Knott com 5% de significância.

Não foi verificada diferença estatística entre as diferentes concentrações de BAP utilizadas em meio MS ($p > 0,05$). A maior taxa de sobrevivência foi obtida no tratamento controle e, dentre os diferentes tempos de exposição ao PVS2, não foi verificada diferença estatística entre os tempos de 15 e 30 minutos. A baixa porcentagem de sobrevivência dos ápices tratados com 45 minutos de PVS2 indica toxidez provocada pela solução de vitrificação (Gráfico 3).

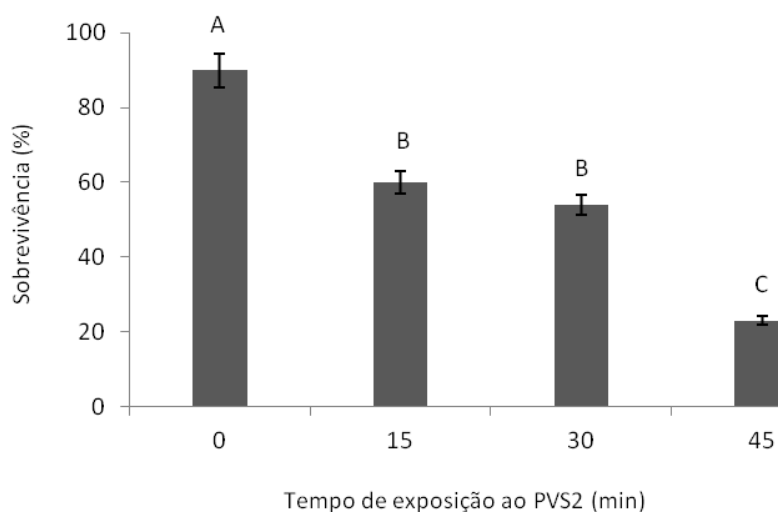


Gráfico 3 Porcentagem de sobrevivência de explantes apicais de *C. pubescens* em relação ao tempo de exposição ao PVS2. Letras iguais não diferem entre si estatisticamente segundo Teste de Scott-Knott com 5% de significância.

Em relação ao número de folhas desenvolvidas após 30 dias de cultivo, o tratamento controle foi o que apresentou os melhores resultados, os demais tratamentos não diferiram estatisticamente entre si (Gráfico 4).

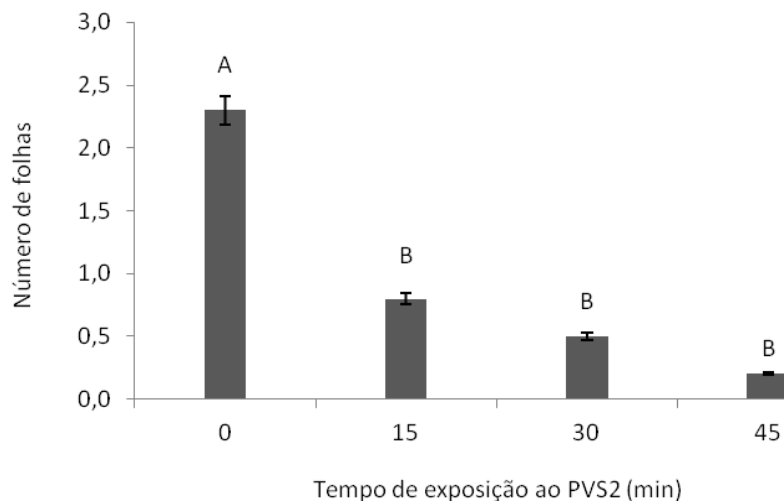


Gráfico 4 Média do número de folhas em ápices caulinares de *C. pubescens* após diferentes tempos de exposição ao PVS2. Letras iguais não diferem entre si estatisticamente segundo Teste de Scott-Knott com 5% de significância

Embora não haja diferença estatística pode-se notar visualmente que no tratamento de 45 minutos de PVS2, os ápices se encontram oxidados e os primórdios foliares estavam bem menos desenvolvidos (Figura 2).

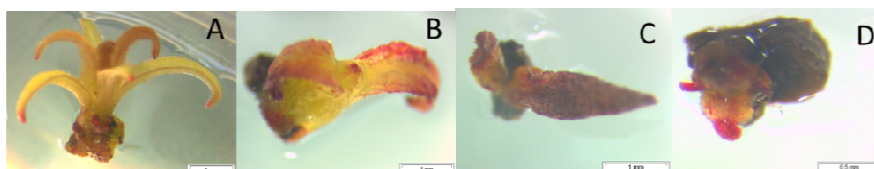


Figura 2 Ápices caulinares de *C. pubescens* após o tratamento com diferentes tempos de PVS2; 0 (A), 15 (B), 30 (C) e 45 (D) minutos.

Os açúcares, em especial a sacarose, exercem papel fundamental na adaptação das células vegetais aos diferentes tipos de estresse. A sacarose é considerada como um dos principais componentes osmóticos por ser um produto natural da fotossíntese e ser o carboidrato mais comumente translocado nas

plantas (CARPENTIER et al., 2010). Além disso, a sacarose é reconhecida como uma importante molécula sinalizadora que afeta uma diversidade de respostas fisiológicas (FINKELSTEIN; GAMPALA; ROCK, 2002; KOCH, 1996; PANIS et al., 1996). O tratamento com concentrações mais altas de sacarose tem se mostrado essencial à sobrevivência à severa desidratação pela qual são submetidos os explantes criopreservados (PANIS et al., 2002) e mais eficiente do que o uso de outros açúcares como o sorbitol por exemplo (CARPENTIER et al., 2010). Confirmando essas afirmações, Silva et al. (2013) mostraram que o pré-cultivo de ápices caulinares em meio com 0,3 M de sacarose aumentou consideravelmente a taxa de sobrevivência após a criopreservação de meristemas de *Byrsonima intermedia*, uma espécie também nativa do Cerrado. Santos (2013), estudando parâmetros da criopreservação de mangabeira, também verificou aumento na sobrevivência de ápices caulinares criopreservados quando submetidos ao pré-cultivo por 24 h em meio com 0,3 M de sacarose.

O uso de crioprotetores como a sacarose, DMSO, etileno glicol, dentre outros, tem se mostrado essencial na criopreservação, pois ajuda a proteger o material vegetal dos danos causados pelo congelamento (HOOI et al., 2010; SAKAI; HIRAI; NIINO, 2008), no entanto, os mesmos crioprotetores que protegem podem exercer efeito tóxico e causar perda da viabilidade do material vegetal se utilizados em concentrações, temperaturas ou tempos de exposição prolongados. Por isso o estudo do período de exposição dos explantes ao crioprotetor é de extrema importância para o sucesso da criopreservação (HOOI et al., 2010).

A solução de vitrificação utilizada neste trabalho, a PVS2, tem sido utilizada com sucesso na criopreservação de diversas espécies (PANIS et al., 2005; HOOI et al., 2010; SILVA et al., 2013), mas por conter DMSO pode ser tóxico às plantas (SAKAI; HIRAI; NIINO, 2008). Este componente é

considerado tóxico com a elevação da temperatura, principalmente, quando misturado à água. Além disso, esta substância tem a capacidade de induzir diferenciação celular, podendo exercer influência no nível de regulação gênica, além de promover desnaturação proteica, sendo esses fatores influenciados pelo tempo de exposição e temperatura (YU; QUINN, 1994).

O período ótimo de exposição ao DMSO varia de espécie para espécie e também entre os tecidos (HOOI et al., 2010). Sendo assim, deve-se determinar, previamente, o tempo ótimo de imersão do explante em PVS2 e a temperatura (geralmente utilizada a 0° C), para que haja alta taxa de regeneração após a criopreservação (ENGELMANN, 2011). Silva et al. (2013), utilizando a técnica da *droplet vitrification*, relataram o tempo de 30 minutos de exposição dos explantes ao PVS2 como ótimo para a criopreservação de ápices caulinares de uma espécie nativa do Cerrado. Outra espécie nativa criopreservada com sucesso através da *droplet vitrification*, é a mangaba (*Hancornia speciosa*) (SANTOS, 2013). Para essa espécie o tempo de exposição ao crioprotetor considerado ótimo foi de vinte minutos. Kaya et al. (2013) criopreservaram com sucesso 13 espécies de eucalipto utilizando a técnica *droplet-vitrification*, sendo que para a maioria das espécies estudadas o tempo de exposição ao PVS2 que proporcionou maior sobrevivência dos explantes foi 60 minutos, porém para 3 espécies o tempo de 30 minutos foi considerado o tempo ótimo, assim como o resultado obtido neste trabalho.

3.3 Criopreservação e retomada do crescimento

Conforme observado no Gráfico 4, a exposição dos ápices ao PVS2 por 45 minutos promoveu uma redução na sobrevivência dos explantes. Não foi observada a interação tipo de explante x tempo de PVS2. Após 15 ou 30 minutos

de exposição ao PVS2, a sobrevivência dos explantes criopreservados foi de 54% e 53,5%, respectivamente (Gráfico 5).

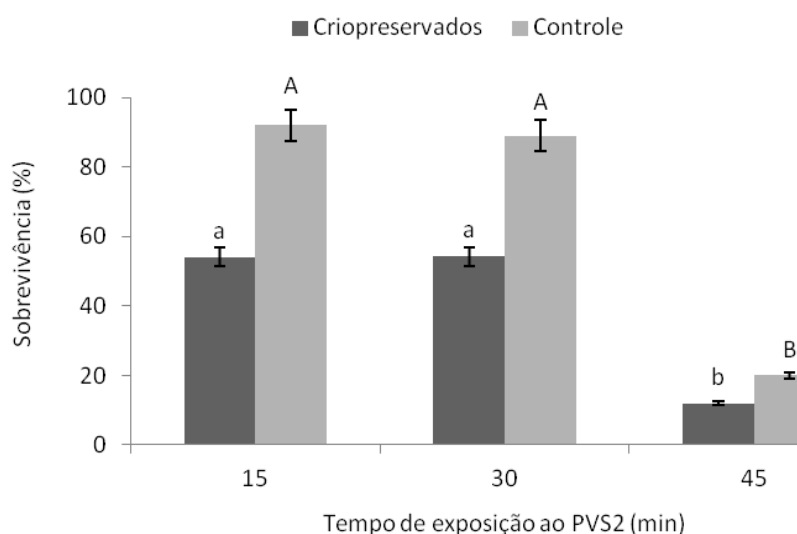


Gráfico 5 Porcentagem de explantes sobreviventes após a criopreservação com diferentes tempos de exposição ao PVS2. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si segundo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Os ápices sobreviventes provenientes dos tratamentos com 15 e 30 minutos de PVS2 foram transferidos para meio de multiplicação, MS suplementado com 4,4 μM de BAP, e após 45 dias mostraram o desenvolvimento de primórdios foliares, porém não houve o alongamento das brotações mesmo após 60 dias de cultivo (Figura 3).

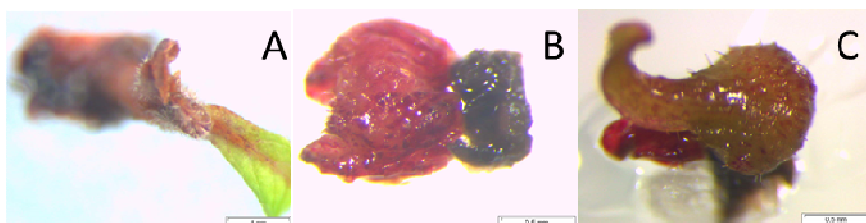


Figura 3 Ápices caulinares de *C. pubescens* após 60 dias da criopreservação em meio MS suplementado com 4,4 μ M de BAP, após 0 (A), 15 (B) e 30 (C) minutos em PVS2.

A criopreservação de ápices caulinares de *Byrsinima intermedia* foi obtida com sobrevivência de aproximadamente 100%, porém da mesma forma como relatado neste trabalho, o completo desenvolvimento e regeneração dos explantes não foi obtida (SILVA et al., 2013). Da mesma forma, Marković et al. (2013) criopreservaram ápices caulinares de parreira e conseguiram alta taxa de sobrevivência, porém a retomada do crescimento ainda precisa ser otimizada. O não-crescimento dos ápices criopreservados pode ser explicado pelo alto grau de estresse sofrido pelos explantes, que pode causar alterações metabólicas, necessitando assim da otimização das condições de cultivo pós-crio.

4 CONCLUSÕES

Ápices caulinares se regeneram *in vitro* com mais sucesso que gemas axilares.

O pré-cultivo em meio com alta concentração de sacarose tem efeito positivo na sobrevivência dos explantes independente do tempo de exposição ao PVS2.

A sobrevivência dos ápices caulinares é reduzida após 45 minutos de contato com a solução de vitrificação PVS2, prejudicando o desenvolvimento dos explantes.

Ápices caulinares podem ser criopreservados após 15 ou 30 minutos de exposição ao PVS2 com taxa de sobrevivência superior a 50%.

REFERÊNCIAS

CARDOSO, C. A. et al. Antimicrobial activity of the extracts and fractions of hexanic fruits of *Campomanesia* species (Myrtaceae). **Journal of Medicinal Food**, New Rochele, v. 13, n. 5, p. 1273-1276, oct. 2010.

CARPENTIER, S.C. et al. Sugar-mediated acclimation: the importance of sucrose metabolism in meristems. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 9, n. 10, p. 5038-5046, July 2010.

DICKEL, M. L.; RATES, S. M. K.; RITTER, M. R. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 109, n. 1, p. 60-71, Jan. 2007.

DOUSSEAU, S. et al. Ecofisiologia da germinação de sementes de *Campomanesia pubescens*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1362-1368, 2011.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cell & Developmental Biology**, Gaithersburg, v. 47, n. 1, p. 5-16, Feb. 2011.

FELFILI, J. M. et al. Potencial econômico da biodiversidade do Cerrado: estágio atual e possibilidades de manejo sustentável dos recursos da flora. In: AGUIAR, L. M. S.; CAMARGO, A. J. A. (Ed.). **Cerrado: ecologia e caracterização**. Brasília: EMBRAPA, 2004. p. 177-220.

FINKELSTEIN, R.R.; GAMPALA, S.S.; ROCK, C.D. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 1, p. 15-45, May 2002. Supplement.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Dordrecht: The Background, 2008. v. 1, 709 p.

HOOI, T.H. et al. A novel approach for preliminar PVS2 vitrification optimization parametes of *Dendrobium Sonia-28* Orchid with evan blue staining. **Advances in Environmental Biology**, Amman, v. 4, n. 2, p. 284-290, 2010.

KAYA, E.; ALVES, A.; RODRIGUES, L.; JENDEREK, M.; HERNANDEZ-ELLIS, M.; OZUDOGRU, A.; ELLIS, D. Cryopreservation of Eucalyptus genetic resources. **Cryo-Letters**, London, v. 34, n. 6, p. 608-618, nov., 2013.

KARTHA, K. K. Meristem culture and germplasm preservation. In: _____. **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton: CRC, 1985. p. 115-134.

KLAFKE, J. Z. et al. Antiplatelet, antithrombotic, and fibrinolytic activities of *Campomanesia xanthocarpa*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Thousand Oaks, v. 2012, p. 1-9, 2012.

KLAFKE, J. Z. et al. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 127, n. 2, p. 299-305, Feb. 2010.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, Boston, v. 19, n. 3, p. 707-713, June 2005.

KOCH, K.E. Carbohydrate-modulate gene expression in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 509-540, 1996.

MARKOVIC, Z. et al. Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) *in vitro* shoot tips. **Central European Journal of Biology**, London, v. 8, n. 10, p. 993-1000, 2013.

MASETTO, T. E. et al. Desiccation tolerance and DNA integrity in *Eugenia pleurantha* O. Berg. (Myrtaceae) seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 175-180, 2008.

MELCHIOR, S. J. et al. Colheita e armazenamento de sementes de gabioba (*Campomaneisa adamantium* Camb. - Myrtaceae) e implicações na germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 141-150, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.

OLIVEIRA, L. J. et al. Características agronômicas e atividade da redutase do nitrato em plantas de *Campomanesia sp.* sob estresse hídrico. **Revista Agrarian**, Dourados, v. 4, n. 11, p. 43-53, 2011.

PANIS, B. et al. Cryopreservation of banana (*Musa spp*) meristem cultures after preculture on sucrose. **Plant Science**, Shannon, v. 121, n. 1, p. 95-106, Nov. 1996.

PANIS, B. et al. Sucrose preculture to simplify cryopreservation of banana meristem cultures. **Cryo-Letters**, Lewes, v. 23, n. 6, p. 375-384, Nov./Dec. 2002.

PANIS, B.; SWENNEN, B. P. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant Science**, Shannon, v. 168, n. 1, p. 45-55, Jan. 2005.

PAVAN, F. R. et al. Evaluation of anti-QMycobacterium tuberculosis activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 1222-1226, maio 2009.

PILATTI, F. K. et al. *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, Gaithersburg, v. 4, n. 1, p. 82-98, Feb. 2011.

SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS2-based vitrification and encapsulation: vitrification protocols. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant cryopreservation: a practical guide**. Corvallis: Springer, 2008. p. 33-58.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Criopreservation of nucellar of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. Var. *Brasiliensis* Tanaka). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 9, n. 1, p. 30-33, 1990.

SANTOS, M. S. et al. Quantification of the major bioactive phytochemical in the gabirola (*Campomanesia xanthocarpa* Berg) juice. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 35, n. 4, p. 783-787, 2013.

SANTOS, P. A. A. **Cultivo e conservação *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes**. 2013. 98 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

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**, Lewes, v. 34, n. 4, p. 338-348, 2013.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APGILL**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 132 p.

VINAGRE, A. S. et al. Anti-diabetic effects of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg) leaf decoction. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 46, n. 2, p. 169-177, 2010.

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