

**CRIOPRESERVAÇÃO DE ÁPICES CAULINARES DE *Pfaffia*  
*glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN.**

**DANIELA VASCONCELOS DE OLIVEIRA**

**TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS**

**FACULDADE DE TECNOLOGIA**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE ÁPICES CAULINARES DE *Pfaffia  
glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN.**

**DANIELA VASCONCELOS DE OLIVEIRA**

**ORIENTADOR: PROFº. Dr. ILDEU SOARES MARTINS  
CO-ORIENTADORA: Dr<sup>a</sup>. IZULMÉ RITA IMACULADA SANTOS**

**TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS**

**PUBLICAÇÃO: PPGEFL. TD - 076/2017  
BRASÍLIA/DF: FEVEREIRO - 2017**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE ÁPICES CAULINARES DE *Pfaffia glomerata***  
**(SPRENG.) PEDERSEN.**

**DANIELA VASCONCELOS DE OLIVEIRA**

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS, DO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL, DA FACULDADE DE TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR.**

**APROVADA POR:**

---

**Prof. Dr. Ildeu Soares Martins (Departamento de Engenharia Florestal, UnB);**  
**(Orientador);**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosana de Carvalho Cristo Martins (Departamento de Engenharia Florestal, UnB);**  
**(Examinador Interno)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr. Ricardo de Oliveira Gaspar (Departamento de Engenharia Florestal, UnB);**  
**(Examinador Interno)**

---

**Dr<sup>a</sup>. Juliana Martins de Mesquita Matos (Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, UnB);**  
**(Examinador Externo)**

---

**Dr<sup>a</sup>. Rosa de Belem das Neves Alves (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia);**  
**(Examinador Externo)**

---

**Prof. Dr. Reginaldo Pereira (Departamento de Engenharia Florestal, UnB);**  
**(Examinador suplente)**

**Brasília, 24 de Fevereiro de 2017.**

## FICHA CATALOGRÁFICA

OLIVEIRA, DANIELA VASCONCELOS DE

Criopreservação de ápices caulinares de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. [Distrito Federal] 2017.

xvi, 114p., 210 x 297 mm (ENE/FT/UnB, Doutor, Tese de Doutorado - Universidade de Brasília Faculdade de Tecnologia

Departamento de Engenharia Florestal

1. Criopreservação

2. Ginseng brasileiro

3. Vitrificação

4. Gota vitrificação

I. ENE/FT/UnB

II. Título (série)

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

OLIVEIRA, D.V. (2017). Criopreservação de ápices caulinares de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. PPGENE. TD - 076/2017, Departamento de Engenharia Florestal, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 114p.

## CESSÃO DE DIREITOS

AUTOR: Daniela Vasconcelos de Oliveira.

TÍTULO: Criopreservação de ápices caulinares de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen.

GRAU: Doutor

ANO: 2017

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta tese de doutorado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte dessa tese de doutorado pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor.

---

Daniela Vasconcelos de Oliveira

SGAN 913 Módulo F nº 28, Asa Norte.

70.790-130 Brasília - DF - Brasil.

DEDICO...

A Deus, meu amor maior e a minha mãe Maria Santíssima.

OFEREÇO...

À minha Família, em especial a meus pais

Waldeci e Heloisa.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus que se faz presente em cada momento da minha vida;

A meus pais, Heloísa e Waldeci, que juntos me deram todo o apoio necessário para que alcançasse este objetivo;

Ao meu marido, Anderson, que com amor e cuidado ajudou-me a manter-me focada durante esse curso;

Ao meu irmão Luciano e sua família, Jucyane, Beatriz e Gustavo que, me deram o incentivo para a conclusão desse curso;

A minha vó Maria Terezinha e a minha tia Nazaré, que acompanharam de perto os meus estudos;

Ao meu orientador, Professor Ildeu que, com zelo, atenção e disponibilidade, proporcionou-me o apoio necessário para o sucesso desse Trabalho;

A minha orientadora Dra. Izulmé que, com muita dedicação e carinho, acolheu-me e proporcionou-me o suporte necessário para o êxito desse trabalho;

A minha querida professora Rosana que, com sua amizade, ajudou-me em diversos momentos desse curso;

A minha querida amiga Juliana que, com sua experiência aconselhou-me em diversos momentos durante esse trabalho;

A querida amiga Antonieta Salomão que, com o seu carinho e atenção incentivou-me durante esse trabalho;

As minhas amigas Kenya e Alcione que, incentivaram-me em várias etapas do curso;

A técnica do Laboratório de Criobiologia Vegetal (Cenargen) Rosângela que, pelo apoio técnico ajudou-me para a realização desse trabalho juntamente com as estagiárias que passaram pelo Laboratório;

A Dra. Rosa de Belem que, com seu conhecimento e experiência forneceu-me informações valiosas da espécie objeto de estudo desse trabalho;

Ao Departamento de Engenharia Florestal da UnB corpo docente e funcionários que, proporcionaram -me o suporte necessário pra a realização desse trabalho;

Ao Cenargen (Embrapa) que, me proporcionou todo o apoio de infraestrutura e técnico necessário para a realização desse Trabalho; e

À Capes pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

## RESUMO

### CRIOPRESERVAÇÃO DE ÁPICES CAULINARES DE *Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN.

Autor: Daniela Vasconcelos de Oliveira

Orientador: Ildeu Soares Martins

Co-orientadora: Izulmé Rita Imaculada Santos

Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal

Brasília, Fevereiro de 2017.

O objetivo geral desse trabalho foi desenvolver um protocolo de criopreservação para ápices caulinares de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, ginseng brasileiro, visando assegurar a conservação em longo prazo do seu germoplasma. Inicialmente foram estabelecidas as condições para a introdução e multiplicação clonal *in vitro* de *Pfaffia glomerata*, a partir de gemas laterais de segmentos nodais de plantas em crescimento em campo, para obter o lote de plantas doadoras de ápices caulinares para os experimentos de criopreservação. Após 30 dias de cultivo *in vitro* 91% das gemas laterais retomaram o crescimento dando origem a plântulas inteiras, com sistema radicular e parte aérea bem desenvolvidos. Para a definição do protocolo de criopreservação foram testadas duas técnicas, a vitrificação e a gota-vitrificação. A técnica de vitrificação consistiu dos seguintes procedimentos: isolamento dos ápices caulinares ( $\pm 2,0$  mm) de plântulas em crescimento *in vitro*, pré-cultivo em meio de cultura MS básico, solidificado com ágar e suplementado com 0,3M de sacarose por aproximadamente 18 hrs, tratamento com meio de saturação (MS básico líquido suplementado com 2,0M de glicerol e 0,4M de sacarose, vitrificação com três soluções crioprotetoras (PVS<sub>2</sub>, PVS<sub>3</sub> e PVS<sub>4</sub>), três tempos de exposição (20 min, 40 min e 60 min), e duas temperaturas para cada solução (25°C e 0°C), congelamento em nitrogênio líquido (-196°C), descongelamento, diluição (MS suplementado com 1,2 M de sacarose) e cultivo *in vitro*. Para a metodologia de vitrificação o melhor percentual de regeneração foi 64%, obtido para ápices caulinares tratados com a solução PVS<sub>4</sub>, por 60 minutos, a 25°C. Para o método de gota-vitrificação, as etapas utilizadas foram semelhantes, consistindo de isolamento dos explantes, pré-cultivo (MS sólido suplementado com 0,3M de sacarose), saturação (MS líquido suplementado com 2,0 M de glicerol e 0,4M de sacarose), vitrificação com três soluções (PVS<sub>2</sub>, PVS<sub>3</sub> e PVS<sub>4</sub>), três tempos de exposição (20 min, 40 min e 60 min), e duas temperaturas (25°C e 0°C), congelamento dos ápices caulinares dispostos em tiras de alumínio e submersos diretamente em nitrogênio líquido, descongelamento, diluição (MS suplementado com 1,2M de sacarose) e cultivo *in vitro*. As melhores condições para o congelamento pelo método de gota-vitrificação foi o tratamento com a solução PVS<sub>3</sub>, por 40 minutos, a 0°C, o que resultou em 82% de regeneração. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a criopreservação em nitrogênio líquido pode ser usada para a conservação do germoplasma de ginseng brasileiro. O método mais eficiente, com maior percentual de regeneração dos ápices caulinares (82%) foi o método de gota-vitrificação, adotando-se o tempo de 40 minutos de exposição dos explantes à solução crioprotetora PVS<sub>3</sub>, na temperatura de 0°C.

Palavras - chave: Ginseng-brasileiro; gota-vitrificação, vitrificação; cultura de tecidos *in vitro*; *Pfaffia glomerata*.

## ABSTRACT

### CRYOPRESERVATION OF *Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN SHOOT TIPS.

Author: Daniela Vasconcelos de Oliveira

Advisor: Ildeu Soares Martins

Co-leader: Izulmé Rita Imaculada Santos

Postgraduate Program in Forestry Engineering

Brasília, February 2017.

The main objective of this work was to develop a cryopreservation protocol for *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen shoot tips, in order to ensure the long-term conservation of its germplasm. The conditions for introduction *in vitro* and clonal multiplication of *Pfaffia glomerata* from lateral buds of nodal segments of plants growing in the field were established to obtain the batch of stock donor plants for the cryopreservation experiments. After 30 days of culture *in vitro* 92% of the lateral buds resumed growth giving rise to whole plantlets, with well developed root system and shoots. For the definition of the cryopreservation protocol, two techniques were tested, vitrification and drop-vitrification. The vitrification technique consisted of the following procedures: isolation of shoot apices ( $\pm 2.0$  mm) from *in vitro* growing plantlets, pre-culture (MS culture medium, solidified with agar and supplemented with 0.3M sucrose), loading with MS medium supplemented with 2.0M glycerol and 0.4M sucrose), vitrification with three cryoprotectant solutions (PVS<sub>2</sub>, PVS<sub>3</sub> and PVS<sub>4</sub>), three exposure times (20 min, 40 min and 60 min), two temperatures for each solution (25°C and 0°C), freezing in liquid nitrogen (-196°C), thawing, dilution (MS medium supplemented with 1.2 M sucrose) and culture *in vitro*. For the drop-vitrification method, the steps used were similar, consisting of excision of the shoot tips, pre-culture of explants (solid MS supplemented with 0.3M sucrose), loading (liquid MS supplemented with 2.0M glycerol and 0.4M sucrose), vitrification (PVS<sub>2</sub>, PVS<sub>3</sub> and PVS<sub>4</sub>), three exposure times (20 min, 40 min and 60 min), and two temperatures (25°C and 0°C), freezing of the shoot apices arranged in aluminum strips and submerged directly into liquid nitrogen, thawing, dilution (MS supplemented with 1.2M sucrose) and *in vitro* culture. The best conditions for cryopreservation using the droplet-vitrification method were treatment with PVS<sub>3</sub> solution for 40 minutes at 0°C, which resulted in 82% regeneration. The results obtained with this work indicate that cryopreservation in liquid nitrogen can be used for conservation of germplasm of Brazilian ginseng. The most efficient method, with the highest percentage of shoot tip regeneration (82%), was the droplet-vitrification method, with 40 minutes of exposure of the explants to the cryoprotectant solution PVS<sub>3</sub> at 0°C.

Key words: Ginseng - Brazilian; vitrification; fabric culture.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL .....	17
OBJETIVOS .....	19
HIPÓTESE .....	20
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	35
CAPÍTULO I - DESENVOLVIMENTO DE UM PROCEDIMENTO SIMPLIFICADO PARA INTRODUÇÃO E MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Pfaffia glomerata</i> (SPRENG.) PEDERSEN. ....	46
1.1 INTRODUÇÃO .....	47
1.2 METODOLOGIA .....	48
1.2.1 Material vegetal.....	48
1.2.2 Descontaminação.....	48
1.2.3 Introdução e multiplicação in vitro.....	49
1.2.4 Análise estatística.....	49
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
1.4 CONCLUSÕES .....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54
CAPÍTULO II - CRIOPRESERVAÇÃO DE ÁPICES CAULINARES DE <i>Pfaffia</i> <i>glomerata</i> (SPRENG.) PEDERSEN PELO MÉTODO DE VITRIFICAÇÃO .....	58
2.1 INTRODUÇÃO .....	59
2.2 METODOLOGIA .....	60
2.2.1 Introdução e multiplicação in vitro de <i>P. glomerata</i> .....	60
2.2.2 Cultivo de segmentos nodais.....	60
2.2.3 Pré-cultivo e vitrificação dos ápices caulinares.....	61
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	65
2.4 CONCLUSÕES .....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	82
CAPÍTULO III - CRIOPRESERVAÇÃO DE ÁPICES CAULINARES DE <i>Pfaffia</i> <i>glomerata</i> (SPRENG.) PEDERSEN PELO MÉTODO DE GOTA VITRIFICAÇÃO .....	85

3.1 INTRODUÇÃO .....	86
3.2 METODOLOGIA .....	87
3.2.1 Explantes.....	87
3.2.2 Gota vitrificação dos explantes.....	88
3.2.3 Análise estatística dos dados.....	92
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	93
3.4 CONCLUSÕES .....	110
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	111
CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES .....	114

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de diferentes soluções de vitrificação.....	30
Tabela 1.1 - Percentuais de regeneração de segmentos nodais de <i>P. glomerata</i> .....	52
Tabela 2.1 - Análise de Variância da regeneração de <i>Pfaffia glomerata</i> considerando os fatores nitrogênio, temperatura, tempo e solução, bem como suas interações.....	65
Tabela 2.2 - Análise de Variância considerando o fator solução no Nitrogênio 1 (-N <sub>2</sub> L).....	66
Tabela 2.3 - Médias para o estudo do efeito de solução no nitrogênio 1 (-N <sub>2</sub> L).....	66
Tabela 2.4 - Análise de Variância considerando o fator solução no Nitrogênio 2 (+N <sub>2</sub> L).....	66
Tabela 2.5 - Médias para o estudo do efeito de solução no nitrogênio 2 (+N <sub>2</sub> L).....	66
Tabela 2.6 - Análise de Variância da regeneração de <i>Pfaffia glomerata</i> em função do tempo.....	67
Tabela 2.7 - Análise de Variância da regeneração de <i>Pfaffia glomerata</i> em função do tempo, decomposta em polinômios ortogonais, no Nitrogênio 2 (+N <sub>2</sub> L).....	67
Tabela 2.8 - Análise de Variância da regeneração em função da temperatura no Nitrogênio 1 (-N <sub>2</sub> L).....	67
Tabela 2.9 - Médias para o estudo do efeito de temperatura no nitrogênio 1 (-N <sub>2</sub> L).....	68
Tabela 2.10 - Análise de Variância da regeneração em função da temperatura no Nitrogênio2 (+N <sub>2</sub> L).....	68
Tabela 2.11 - Médias para o estudo do efeito de temperatura no nitrogênio 2 (+N <sub>2</sub> L).....	68
Tabela 2.12 - Análise de Variância da regeneração em função do Nitrogênio.....	68
Tabela 2.13 - Médias para o estudo do efeito de regeneração em função do nitrogênio.....	69

Tabela 2.14 - Resultado do Teste de vitrificação da espécie <i>Pfaffia glomerata</i> , na solução PVS <sub>2</sub> , nas temperaturas de 25°C e 0°C, e tempo de exposição de 20 e 40 minutos.....	69
Tabela 2.15.- Resultado do Teste de vitrificação da espécie <i>Pfaffia glomerata</i> , na solução PVS <sub>3</sub> , 25°C e 0°C.....	73
Tabela 2.16 - Resultado do Teste de vitrificação da espécie <i>Pfaffia glomerata</i> , na solução PVS <sub>4</sub> , 25°C e 0°C, nos tempos de exposição de 20, 40 e 60 minutos.....	77
Tabela 3.1 - Análise de Variância dos resultados de regeneração de explantes de <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen, considerando-se os fatores nitrogênio, temperatura de exposição à solução de vitrificação, tempo de exposição à solução de vitrificação e solução de vitrificação, bem como suas interações.....	93
Tabela 3.2 - Análise de Variância considerando o fator solução de vitrificação na ausência de nitrogênio 1 (-N <sub>2</sub> L).....	94
Tabela 3.3 - Médias para o estudo do efeito de solução de vitrificação na ausência de nitrogênio 1 (-N <sub>2</sub> L).....	94
Tabela 3.4 - Análise de Variância considerando o fator solução de vitrificação em presença de Nitrogênio 2 (+N <sub>2</sub> L).....	94
Tabela 3.5 - Médias para o estudo do efeito de de vitrificação em presença de Nitrogênio 2 (+N <sub>2</sub> L).....	94
Tabela 3.6 - Análise de Variância considerando a regeneração em função da ausência de nitrogênio líquido na solução de vitrificação1 (PVS <sub>2</sub> ).....	95
Tabela 3.7 - Médias para o estudo do efeito de nitrogênio líquido sobre a solução de vitrificação 1 (PVS <sub>2</sub> ).....	95
Tabela 3.8 - Análise de Variância considerando a regeneração em função de nitrogênio líquido na solução de vitrificação 2 (PVS <sub>3</sub> ).....	95
Tabela 3.9 - Médias para o estudo do efeito de nitrogênio líquido na solução de vitrificação PVS <sub>3</sub> .....	95
Tabela 3.10 - Análise de Variância considerando a regeneração em função de nitrogênio líquido na solução de vitrificação PVS <sub>4</sub> .....	96
Tabela 3.11 - Médias para o estudo do efeito de nitrogênio líquido na solução de vitrificação PVS <sub>4</sub> .....	96
Tabela 3.12 - Percentuais de regeneração de ápices caulinares de <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen tratados com solução de vitrificação PVS <sub>2</sub> a 25°C e 0°C.....	96

Tabela 3.13 - Resultado Percentuais de regeneração de ápices caulinares de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen tratados com solução de vitrificação PVS<sub>3</sub>, 25°C e 0°C.....101

Tabela 3.14 - Percentuais de regeneração de ápices caulinares de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen tratados com solução de vitrificação PVS<sub>4</sub>, 25°C e 0°C.....105

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Pfaffia glomerata</i> em condições naturais de campo.....	33
Figura 2 - Inflorescências de <i>Pfaffia glomerata</i> . ....	34
Figura 3 - Raiz de <i>Pfaffia glomerata</i> . ....	34
Figura 1.1 - <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng) Pedersen. ....	50
Figura 1. 2 - Parte de ramos (A) e segmentos nodais (B) obtidos de plantas adultas de <i>Pfaffia glomerata</i> . (Spreng) Pedersen. ....	50
Figura 1. 3 - Aspecto de plântulas obtidas a partir de segmentos nodais de <i>P. glomerata</i> .....	51
Figura 2.1 - Plântulas de <i>Pfaffia glomerata</i> (A) e explantes em meio de pré-cultivo (B).....	61
Figura 2.2 - Método de vitrificação.....	62
Figura 2.3 - Método de vitrificação (A) e congelamento em NL (B).....	63
Figura 2.4 - Porcentagem de regeneração de ápices caulinares de <i>P. glomerata</i> após a vitrificação com PVS <sub>2</sub> , em duas temperaturas distintas (0°C e 25°C), por 20, 40 e 60 minutos.....	70
Figura 2.5 - Aspecto das plântulas obtidas a partir de AC de <i>P. glomerata</i> que foram submetidos ao tratamento de vitrificação com a solução PVS <sub>2</sub> em duas temperaturas distintas (0°C e 25°C), por 20, 40 e 60 minutos, e seus respectivos controles.....	71
Figura 2.6 - Aspecto das plântulas obtidas de AC de <i>P. glomerata</i> submetidos à vitrificação com PVS <sub>2</sub> , a 25°C por 20 (A), 40 (B) e 60 (C) minutos criopreservados em nitrogênio líquido.....	72
Figura 2.7 - Aspecto das plântulas obtidas de AC de <i>P. glomerata</i> submetidos à vitrificação com PVS <sub>2</sub> , a 0°C por 20 (A), 40 (B) e 60 (C) minutos criopreservados em nitrogênio líquido.....	72
Figura 2.8 - Percentuais de regeneração de AC de <i>P. glomerata</i> após a vitrificação com PVS <sub>3</sub> , em duas temperaturas distintas (0°C e 25°C), por 20, 40 e 60 minutos.....	74
Figura 2.9 - Aspecto das plântulas obtidas a partir de AC de <i>P. glomerata</i> que foram submetidos ao tratamento de vitrificação com a solução PVS <sub>3</sub> em duas temperaturas	

distintas (0°C e 25°C), por 20, 40 e 60 minutos, e seus respectivos controles.....	75
Figura 2.10 - Aspecto das plântulas obtidas de AC de <i>P. glomerata</i> submetidos à vitrificação com PVS <sub>3</sub> , a 25°C por 20 (A), 40 (B) e 60 (C) minutos criopreservados em nitrogênio líquido.....	76
Figura 2.11 - Aspecto das plântulas obtidas de AC de <i>P. glomerata</i> submetidos à vitrificação com PVS <sub>3</sub> , a 0°C por 40 (A) e 60 (B) minutos criopreservados em nitrogênio líquido.....	78
Figura 2.12 - Percentuais de regeneração de AC de <i>P. glomerata</i> após a vitrificação com PVS <sub>4</sub> , em duas temperaturas distintas (0°C e 25°C), por 20, 40 e 60 minutos.....	78
Figura 2.13 - Aspecto das plântulas obtidas a partir de AC de <i>P. glomerata</i> que foram submetidos ao tratamento de vitrificação com a solução PVS <sub>4</sub> em duas temperaturas distintas (0°C e 25°C), por 20, 40 e 60 minutos, e seus respectivos controles.....	79
Figura 2.14 - Plântulas de <i>P. glomerata</i> em PVS <sub>4</sub> , 25°C, NL+, A- 20 min.; B- 40 min.; C- 60 min.....	80
Figura 2.15 - Plântulas de <i>P. glomerata</i> em PVS <sub>4</sub> , NL+, 0°C, A- 20 min.; B- 40 min e C- 60 min.....	80
Figura 3.1 - Plântulas de <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen desenvolvidas em meio de cultura MS após 15 dias de inoculação.....	88
Figura 3.2 - Esquema ilustrativo das etapas da técnica de gota vitrificação utilizada em ápices caulinares de <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen.....	89
Figura 3.3 - Cabine de fluxo laminar onde foram conduzidos os testes de gota vitrificação com AC de <i>P. glomerata</i> (Spreng.) Pedersen.....	91
Figura 3.4 - Percentuais de regeneração de AC de <i>P. glomerata</i> (Spreng.) Pedersen tratados com solução de vitrificação PVS <sub>2</sub> em diferentes condições.....	98
Figura 3.5 - Plântulas de <i>P. glomerata</i> (Spreng.) Pedersen desenvolvidas após tratamento com solução de vitrificação PVS <sub>2</sub> .....	99
Figura 3.6 - Regeneração de explantes de <i>P. glomerata</i> (Spreng.) Pedersen após tratamento em solução de vitrificação PVS <sub>2</sub> , 25°C por 20 minutos (A), 0°C por 40 minutos (B) 25°C e	

por 60 minutos (C) e 0°C 60 minutos (D) seguido de congelamento em nitrogênio líquido.....	100
Figura 3.7 - Porcentagem de regeneração de ápices <i>P. glomerata</i> no experimento de gota vitrificação.....	102
Figura 3.8 - Plântulas de <i>P. glomerata</i> após o experimentos de gota vitrificação.....	103
Figura 3.9 - Plântulas de <i>P. glomerata</i> após o congelamento.....	104
Figura 3.10 - Percentuais de regeneração de AC de <i>P. glomerata</i> (Spreng.) Pedersen tratados com solução de vitrificação PVS <sub>4</sub> em diferentes condições.....	108
Figura 3.11 - Plântulas de <i>P. glomerata</i> (Spreng.) Pedersen desenvolvidas após tratamento com solução de vitrificação PVS <sub>4</sub> .....	108
Figura 3.12 - Regeneração de explantes de <i>P. glomerata</i> (Spreng.) Pedersen após tratamento em solução de vitrificação PVS <sub>4</sub> e congelamento em nitrogênio líquido.....	109

## INTRODUÇÃO GERAL

O uso indiscriminado dos recursos naturais, as queimadas, o crescimento dos centros urbanos, a expansão das fronteiras agrícolas e outras alterações causadas pelo homem ao meio ambiente têm ocasionado a perda, muitas vezes irrecuperável, da flora brasileira. A conservação *ex situ*, através do armazenamento de germoplasma de interesse em condições controladas, com a máxima integridade genética e biológica possível, é uma importante estratégia para preservar o material genético disponível na natureza (BAJAJ, 1995).

Os programas de conservação *ex situ* de recursos genéticos têm priorizado o estabelecimento de bancos de germoplasma, como estratégia para conservar espécies cultivadas e nativas. Desde o estabelecimento dos primeiros bancos de germoplasma a ênfase foi para a coleta e conservação de espécies utilizadas tradicionalmente na agricultura. Com a crescente perda de recursos genéticos e a degradação dos ecossistemas naturais em todo o mundo, ampliou-se a atuação das coletas de germoplasma passando a incluir recursos genéticos de espécies silvestres, de importância potencial, particularmente das plantas medicinais (WALTER *et al.*, 2005). Para o armazenamento em longo prazo, os bancos convencionais de germoplasma têm utilizado a conservação de sementes secas ( $\pm 5\%$  de teor de água) em câmaras frias nas temperaturas de  $-18$  a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Contudo, este procedimento não é adequado para a conservação de inúmeras espécies de plantas de interesse porque elas não produzem sementes ou porque suas sementes não toleram desidratação para níveis tão reduzidos ou o armazenamento em câmaras frias em temperaturas tão baixas. Além disso, existem evidências de que mesmo nessas temperaturas não há garantia de preservação da estabilidade genética e da integridade biológica das amostras, uma vez que o metabolismo das sementes não é interrompido completamente e sua deterioração pode ser detectada no decorrer do tempo. Portanto, foi necessário buscar outras técnicas para viabilizar a conservação de germoplasma de plantas de interesse. Dentre as técnicas desenvolvidas encontra-se a criopreservação, que consiste no armazenamento de material biológico em nitrogênio líquido, a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Pesquisas vêm mostrando que a criopreservação oferece potencial para a conservação mais segura de sementes e outras estruturas vegetais por muitas décadas, mantendo sua estabilidade genética e suas características fenotípicas, usando pouco espaço,

a um custo competitivo e requerendo muito pouca atenção (ENGELMANN, 1997; STANWOOD & BASS, 1981). Ultimamente, houve um grande avanço das pesquisas em criopreservação de recursos genéticos vegetais, resultando no desenvolvimento de protocolos para numerosas espécies. Entretanto, essas pesquisas têm sido desenvolvidas principalmente para espécies de clima temperado e pouco tem sido realizado com as espécies de clima subtropical e tropical (WETZEL *et al.*, 2003).

A demanda crescente mundial por medicamentos fitoterápicos tem despertado a atenção de muitos pesquisadores para plantas que possuam este potencial (MATTOS & SALIS, 2005). Em 2000, na Europa e nos Estados Unidos, o mercado de medicamentos fitoterápicos alcançou valores de 8,5 e 6,6 bilhões de dólares por ano, respectivamente, com um crescimento de 12% ao ano. No mercado brasileiro, este seguimento responde por 5% do mercado farmacêutico, movimentando cerca de US\$ 400 milhões por ano (HOSTETTMAN *et al.*, 2003). Estima-se que cerca de 25% dos fármacos produzidos atualmente nos países industrializados foram desenvolvidos, direta ou indiretamente, a partir de produtos naturais, especialmente de plantas (YUNES & CALISTO 2011). No Brasil, apesar das crescentes pesquisas em fitoterápicos, a exploração predatória das plantas medicinais, principalmente pela indústria farmacêutica, e a falta de conhecimento de cultivo das espécies de plantas medicinais de interesse e de programas de conservação de germoplasma dessas espécies tem ocasionado a perda da biodiversidade.

Dentre as plantas medicinais nativas do Brasil com potencial de uso industrial encontra-se a fáfia, *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). O gênero *Pfaffia* possui distribuição cosmopolita, inclui cerca de 170 gêneros e cerca de 2000 espécies. No Brasil ocorrem 20 gêneros nativos e aproximadamente 100 espécies (SOUZA & LOURENZI, 2005). Conhecida também como “ginseng-brasileiro”, a espécie vem sendo submetida a extrativismo intenso devido ao uso medicinal de suas raízes. A exploração predatória pode contribuir para a erosão genética da espécie, comprometendo estudos básicos ainda não realizados, tais como biologia floral, sistema reprodutivo e dinâmica de populações (ALVES, 2008).

Segundo Côrrea Júnior (2003), aproximadamente 720 toneladas de raízes de fáfia foram destinadas aos mercados interno e externo, ressaltando que a maior parte do extrativismo ocorreu na Bacia do Rio Paraná. A espécie é exportada principalmente, para o Japão, pelas firmas Sanrisil/SP, Quimer/SP e Casa da *Pfaffia*/SP; para os Estados Unidos pela Sanrisil/SP e Casa da *Pfaffia*/SP e para Alemanha pela Casa da *Pfaffia*/SP. O mercado

absorve tudo o que se produz e só não se comercializa mais por falta da matéria-prima (FERREIRA *et al.*, 1998; MONTANARI JÚNIOR, 2002).

Em 2004 surgiu um Projeto de Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Biológica Brasileira (Probio) que financiou um levantamento realizado por equipes de pesquisadores nas cinco regiões do País. Foram selecionadas 775 espécies nativas denominadas de “Plantas do Futuro”, 99 possuem potencial medicinal, dentre elas encontra-se a *Pfaffia glomerata*. Devido a esta exploração predatória da *Pfaffia glomerata*, é essencial desenvolver metodologias eficazes para a conservação em longo prazo do germoplasma dessa espécie.

Acredita-se que a continuidade de estudos poderá revelar novas funções para a espécie, criar oportunidades para os agricultores, gerar benefícios e desenvolvimento às regiões produtoras, desde que, a sua exploração seja norteada por técnicas de cultivo ambientalmente correto e manejo sustentável (ALVES, 2008).

A tese ora apresentada encontra-se estruturada em três capítulos:

CAPÍTULO 1: “ Desenvolvimento de um procedimento simplificado para introdução e multiplicação *in vitro* de *pfaffia glomerata* (spreng.) Pedersen.”.

CAPÍTULO 2: “Criopreservação de ápices caulinares de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) pedersen pelo método de vitrificação”.

CAPÍTULO 3: “Criopreservação de ápices caulinares de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen pelo método de gota vitrificação”.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GERAL**

Desenvolver um protocolo de criopreservação para a espécie *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, visando assegurar a conservação em longo prazo do seu germoplasma.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o efeito do método de vitrificação para a criopreservação de ápices caulinares de *Pfaffia glomerata*;
- Avaliar o efeito do método da gota-vitrificação para a criopreservação de ápices caulinares de *Pfaffia glomerata*
- Desenvolver o método de introdução e multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata*;

## **HIPÓTESE**

A espécie *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen pode ser conservada a longo prazo pelo método da criopreservação de seu material biológico.

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS**

Em geral, qualquer tecnologia destinada à conservação de germoplasma tem como princípio básico preservar o máximo possível da diversidade genética tanto de espécies, quanto de variedades ou de indivíduos de uma dada espécie, visando a seu uso atual e futuro como fonte de variabilidade genética para programas de melhoramento e também para trabalhos de pesquisa em outras áreas (RAZDAN, 2003).

Existem, basicamente, três estratégias de conservação de germoplasma: *in situ*, *ex situ* e *on farm*. Na conservação *in situ*, as plantas e animais são conservados em suas comunidades naturais. Para realizar esse tipo de conservação existem as chamadas unidades operacionais, destacando-se parques nacionais, reservas biológicas, reservas genéticas, estações ecológicas, santuários de vida silvestre entre outros (FALEIRO *et al.*, 2011).

Na conservação *ex situ*, a variação genética das espécies é conservada fora de suas comunidades naturais. Desdobra-se em várias modalidades entre as quais conservação *in vitro*, em coleções de campo, em câmaras frias, em nitrogênio líquido. Já a conservação *on farm* é uma estratégia complementar à conservação *in situ*, sendo uma das formas para a conservação da agrobiodiversidade. Apresenta como particularidade o fato de envolver recursos genéticos cultivados pelas comunidades locais e populações indígenas, detentoras de grande diversidade de recursos genéticos e de um amplo conhecimento sobre eles (FALEIRO *et al.*, 2011).

A conservação *on farm* envolve, portanto, recursos nativos e exóticos adaptados às condições locais, que estão em contínuo processo de seleção e de melhoramento pelas comunidades locais e populações indígenas (FALEIRO *et al.*, 2011).

A conservação *ex situ* compreende a manutenção de coleções de germoplasma em plantações em campo ou casas de vegetação, de sementes em câmaras frias, de plântulas em crescimento lento utilizando a cultura de tecidos *in vitro* e em nitrogênio líquido utilizando técnicas de criopreservação. A conservação *ex situ* possui algumas vantagens como: manutenção do material em espaço reduzido facilitando o cuidado; otimizando a caracterização e avaliação (coleções em campo ou casa de vegetação), e mantém o material livre de patógenos (coleções *in vitro*). No entanto, dependendo da forma de conservação, existem algumas desvantagens como a interrupção da evolução quando são usadas técnicas que reduzem as atividades vitais do germoplasma por longos períodos; o risco de instabilidade genética nas coleções *in vitro*; a deriva genética (perda aleatória de genes devido à amostragem ou à multiplicação de amostras muito pequenas) e a pressão de seleção, geralmente, quando o material é multiplicado em áreas com condições edafoclimáticas distintas de seu local de coleta (VALOIS *et al.*, 2001).

Os recursos genéticos são conservados nos chamados bancos de germoplasma, onde são conservadas as coleções de germoplasma utilizando-se metodologias diversas. O principal objetivo de um banco genético é a conservação em longo prazo das coleções representativas da diversidade genética das espécies selecionadas, as quais devem conter amostras representativas dos estoques domesticados da cultura e suas formas parentais silvestres. As coleções de base são compostas de sementes ortodoxas, ou seja, sementes que não perdem sua viabilidade quando conservadas em baixa umidade (4% a 6%) e baixas temperaturas (-18°C a -20°C) por muitas décadas. As coleções ativas são aquelas conservadas por curto a médio prazos (12-24 meses), e podem ser usadas para propósitos de pesquisa, caracterização, avaliação e utilização dos acessos conservados. A coleção ativa pode ser dividida em dois ciclos: plantas vivas crescendo no campo e sementes armazenadas para regeneração ou multiplicação de materiais. A coleção ativa normalmente corresponde a um subconjunto da coleção base localizada próximo ao pesquisador (FALEIRO *et al.*, 2011).

As vantagens potenciais dos métodos de conservação *in vitro* são várias e incluem: necessidade de espaço físico relativamente pequeno; manutenção do material vegetal em condições livres de estresses bióticos (pragas e patógenos) e abióticos (condições

ambientais adversas); disponibilidade de material vegetal para propagar grande número de plantas de forma rápida sempre que necessário; potencial para prolongar o tempo necessário para a realização de subcultivos/repicagens; facilidade para ser aplicada nos procedimentos de manipulação genética em virtude de prover, por exemplo, um modo simples de armazenamento de material experimental; permite o acesso imediato ao germoplasma preservado pelos melhoristas; redução dos obstáculos inerentes aos sistemas de quarentena no que diz respeito ao transporte internacional de material vegetal vivo entre centros de pesquisa e outras instituições. Além disso, as técnicas *in vitro* permitem os seguintes procedimentos: conservação de variação somaclonal nas culturas e nas linhagens de células de uso medicinal; armazenamento de pólen com vistas na melhoria de sua longevidade; conservação de germoplasma raro e de espécies ameaçadas de extinção; retardamento do processo de envelhecimento de materiais vegetais (ISLAM *et al.*, 2003; RAZDAN, 2003; WITHERS; ENGELMANN, 1998).

## **CULTURA DE TECIDOS**

O termo cultura de tecidos vegetais é utilizado para definir a cultura asséptica *in vitro* de células, tecidos, órgãos e seus componentes sob condições físicas e químicas definidas. A cultura de tecidos constitui uma importante ferramenta para estudos básicos, como a compreensão dos fatores responsáveis pelo crescimento, metabolismo, diferenciação e morfogênese das células vegetais, bem como para estudos aplicados, como micropropagação, produção de compostos secundários, transformação genética, manutenção de germoplasma *in vitro* e limpeza clonal (SMITH, 2000).

O termo "in vitro" é um termo latino que significa "dentro do vidro". Dessa forma, em condições de assepsia, dentro de recipientes de vidro, sob o efeito de fatores químicos (meio de cultura) e físicos (luz e temperatura), um ambiente artificial é criado, visando proporcionar condições adequadas para o desenvolvimento de células, tecidos e órgãos de plantas, previamente extraídos de uma planta (matriz). O efeito dessas intervenções pode induzir à diferenciação e à multiplicação de órgãos a partir de meristemas ou à diferenciação de tecidos determinados e à indução de formação de pré-meristemas (GAHAN; GEORGE, 2008).

O cultivo *in vitro* baseia-se nos princípios da totipotência e competência celular. A totipotência se refere ao potencial das células vegetais de reproduzirem um organismo

inteiro uma vez submetidas a estímulo apropriado (HARBERLANDT, 1902). No entanto, para as células vegetais reagirem a esse estímulo, precisam apresentar competência celular, que se refere à capacidade das células em reagir a sinais específicos de desenvolvimento, ou seja, expressar o potencial inerente à sua constituição genética (FALEIRO, *et al.*, 2011).

Em plantas medicinais, a cultura de tecidos tem auxiliado na propagação clonal de diversos genótipos, na conservação do germoplasma; na obtenção de novas fontes de variabilidade através do cultivo de calos e células; na engenharia genética e na otimização da produção de metabólitos (PLETSCH, 1998; BOTTA *et al.*, 2001; RAO & RAVISHANKAR, 2002; ARIKAT *et al.*, 2004). Segundo George *et al.* (2008) a cultura de tecidos é separada em duas categorias, de acordo com a organização do crescimento *in vitro*: cultivos com crescimento organizado e cultivos com crescimento não organizado.

### **Cultivos com crescimento organizado:**

- Cultura de meristemas: cultura de ápices caulinares muito pequenos, consistindo do domo meristemático apical com ou sem primórdios foliares, com tamanho entre 0,1 mm e 0,3 mm, dependendo da espécie. Originam eixos caulinares unipolares.
- Cultura de ápices caulinares ou gemas: inicia-se a partir de gemas ou brotos de tamanho maior que os meristemas, contendo vários primórdios foliares, que são conduzidos de forma a produzir múltiplas brotações ou multigemas.
- Cultura de segmentos nodais: inicia-se a partir de gemas laterais existentes nos nós da planta, cada um tendo anexo um pequeno pedaço de tecido do ramo. Entrenós contendo uma ou várias gemas podem ser cultivados.
- Cultura de raízes isoladas: cultura de raízes desconectadas da parte aérea, resultando na produção de um sistema raízes ramificadas.
- Cultura de embriões (resgate): embriões zigóticos são excisados e cultivados para dar origem a plântulas.

### **Cultivos com crescimento não organizado:**

- Cultura de calos: indução do crescimento e manutenção de uma massa de células desorganizada, a partir do crescimento desordenado de pequenos órgãos, pedaços de tecidos ou de células previamente cultivadas.
- Culturas de células em suspensão: cultura de populações de células individuais e pequenos grupos de células, dispersas em meio líquido sob agitação e aeração.
- Cultura de protoplastos: cultura de células vegetais, sem parede celular.
- Cultura de anteras e pólen: cultura de anteras completas contendo micrósporos imaturos, com o objetivo de formar embriões somáticos diretamente sobre o pólen, ou algumas vezes por organogênese passando pela fase de calo.
- Cultura de pólen: culturas iniciadas de grãos de pólen que foram removidos das anteras.

### **CRIOPRESERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS**

A criopreservação é a conservação do material biológico em temperaturas ultrabaixas, geralmente em nitrogênio líquido (NL), a  $-196^{\circ}\text{C}$ , por períodos de tempo longos, potencialmente indefinidos (Touchell *et al.* 2002). A criopreservação tem se mostrado uma metodologia eficiente para o armazenamento de várias estruturas das plantas como: sementes, pólen, embriões somáticos e zigóticos, partes vegetativas como raízes, bulbos, tubérculos, gemas laterais, ápices caulinares, meristemas, dentre outras. Esse método pode assegurar a conservação do material por longos períodos de tempo, pois, à temperatura do nitrogênio líquido o metabolismo celular fica paralisado e a deterioração biológica é praticamente inexistente (BAJAJ, 1995). O armazenamento em um banco criogênico custa relativamente mais barato que outros sistemas disponíveis, o que se deve ao fato de necessitar de espaço reduzido, requerer um mínimo de manutenção (ENGELMANN, 2004).

Além de sua capacidade de permitir o armazenamento de tecidos com baixos riscos ao material conservado (RAZDAN, 2003), outra vantagem da criopreservação é a preservação, por prolongado período, de tecidos com características específicas, como linhagens de células medicinais e produtoras de alcaloides, cultura de pelos radiculares, tecidos geneticamente transformados e linhagens competentes à transformação (PANIS; LAMBARD, 2006). Pode ser também utilizada para os seguintes procedimentos:

erradicação de vírus, bactérias e outros microorganismos fitopatogênicos, fato demonstrado para as culturas de ameixeira, de bananeiras e de videira (BRISON *et al.*, 1997; HELLIOT *et al.*, 2002; PANIS; LAMBARDI, 2006); criosseleção (seleção de amostras com propriedades especiais na população congelada); propagação de espécies em larga escala, baseada no processo de embriogênese somática, como no caso de coníferas, além da manutenção da juvenilidade de tecidos vegetais (ENGELMANN, 2004).

De modo geral, materiais como sementes ortodoxas ou brotos dormentes podem ser criopreservados sem qualquer pré-tratamento, devido à ocorrência natural de desidratação desses materiais. Porém, a maior parte dos explantes criopreservados (suspensão de células, de calos, de ápices caulinares e de embriões) é constituída de altas quantidades de água celular livre, o que os torna sensíveis a danos durante o congelamento ocasionados pela cristalização da água intracelular em gelo. Por essa razão, as células hidratadas necessitam sofrer desidratação artificial para evitar danos por congelamento, o que pode ser conseguido pelo uso de protocolos de criopreservação clássicos e por aqueles baseados na vitrificação, este último muitas vezes mais eficiente (MIAJA *et al.*, 2000). Segundo Santos e Stushnoff (2003), o conteúdo de água das células antes do congelamento é um fator crítico na criopreservação, uma vez que o congelamento é letal quando os níveis de umidade são elevados, como resultado de ruptura da membrana devido ao rápido crescimento de cristais de gelo no protoplasto.

Koster (1991) afirma que a capacidade para sobreviver no estado desidratado é o resultado de adaptações que impeçam a destruição celular, durante a retirada da água; como a água sai de uma célula que não tolera a dessecação, muitos eventos ocorrem: solutos tornam-se mais concentrados, possivelmente aumentando a velocidade das reações químicas destrutivas; alguns solutos podem cristalizar, alterando a força iônica e o pH da solução intracelular.

Quanto aos fatores que determinam o sucesso da criopreservação, cita-se a proteção dos explantes contra injúrias durante o congelamento, as quais podem ocorrer em virtude da formação de cristais de gelo dentro das células que causam o rompimento das organelas e da própria célula (lise celular). Nesse sentido, o estado da água e o equilíbrio osmótico relacionado aos movimentos da água dentro e fora das células são parâmetros de particular importância para a criopreservação, uma vez que a água removida possui papel vital na prevenção da injúria pelo congelamento, essencial para o restabelecimento e para o crescimento do material criopreservado. Outra fonte potencial de dano às células está

relacionada ao incremento na concentração de solutos intracelulares em níveis tóxicos, ou a perdas de solutos vitais durante o congelamento (GONZALEZ-ARNAO *et al.*, 2008; RAZDAN, 2003).

Atualmente existem dois tipos de metodologias para criopreservação: o método clássico e as metodologias contemporâneas.

### **Metodologia Clássica**

Nos protocolos clássicos a fase de congelamento é realizada na presença de gelo, e os protocolos envolvem, de maneira geral, as seguintes fases: a) pré-tratamento dos explantes com soluções crioprotetoras compostas de uma simples substância, ou de uma mistura de substâncias químicas, como o dimetil sulfóxido (DMSO); b) congelamento lento a uma determinada temperatura de pré-congelamento; c) rápida imersão em nitrogênio líquido; d) armazenamento; e) descongelamento rápido; f) restabelecimento (ENGELMANN, 2004). Por sua vez, as substâncias crioprotetoras são usualmente adicionadas progressivamente até uma concentração final, que é inferior àquela das soluções crioprotetoras usadas nos protocolos de vitrificação. Contudo, embora esse pré-tratamento remova alguma água das células, a maior parte é retirada durante a primeira etapa do procedimento de esfriamento (esfriamento lento/pré-congelamento). Assim, na segunda fase do congelamento (imersão rápida em nitrogênio líquido), ocorre a cristalização da água remanescente ou a vitrificação dos solutos intracelulares (GONZALEZ-ARNAO *et al.*, 2008).

### **Metodologia Contemporânea**

As técnicas de criopreservação desenvolvidas mais recentemente são mais simples e estão baseadas na vitrificação. Vitrificação, ou formação do estado vítreo, é o processo através do qual a água sofre uma transição da fase líquida para um estado sólido amorfo e meta-estável (FAHY *et al.*, 1984; FRANKS, 1982). O sólido assim formado é, na verdade, uma solução super-saturada e de alta viscosidade, o que lhe confere as propriedades mecânicas de um sólido embora não haja formação de uma estrutura

cristalina. A transição para o estado vítreo não envolve mudanças químicas, mas apenas mudanças físicas na viscosidade do líquido (SANTOS, 2001).

A principal característica dos protocolos é o drástico processo de desidratação ao qual as amostras (material vegetal/explantes) são submetidas. Esse grau de desidratação celular e de dessecação antes do congelamento é obtido pela exposição a soluções crioprotetoras altamente concentradas (soluções de vitrificação) e/ou a condições físicas de secagem (ar estéril da cabine de fluxo laminar, sílica gel, soluções salinas concentradas). Conseqüentemente, maior eficiência na remoção da água intracelular é alcançada, já que a maior parte, ou toda a água congelável, é retirada durante a fase de desidratação. Decorrida essa fase, as amostras são submetidas ao esfriamento, geralmente realizado de forma rápida pela imersão direta em nitrogênio líquido, o que induz a vitrificação do meio intracelular. Assim, as células, os tecidos e os órgãos são capazes de resistir à exposição à temperatura do NL, pois todos os fatores que influenciam a formação de gelo intracelular são evitados (GONZALEZ-ARNAO *et al.*, 2008; WITHERS; ENGELMANN, 1998).

O método de gota vitrificação, primeiramente foi desenvolvido para a cultura da mandioca, na década de 1980, tem possibilitado bons resultados, com altas taxas de sobrevivência (KARTHA *et al.*, 1980; ENGELMANN, 2004; SANT *et al.*, 2008). Consiste basicamente no tratamento dos explantes com solução que contém substâncias crioprotetoras, desidratação com uma solução de vitrificação. Em seguida, os explantes são dispostos sobre tiras de papel alumínio juntamente com minúsculas gotículas da solução de vitrificação, e as tiras de alumínio são posteriormente imersas em NL para o congelamento e em seguida transferidas para criotubos contendo NL e armazenadas para conservação em longo prazo ou submetidas ao descongelamento para avaliação de sua viabilidade (SANT *et al.*, 2008).

O uso de tiras de papel alumínio, baseia no princípio de que o alumínio por ser um bom condutor do calor propicia uma maior velocidade de congelamento e descongelamento, o que em muitos casos é requerido para a sobrevivência ao congelamento (LEUNUFNA; KELLER, 2003). Altas velocidades de congelamento, cerca de  $130^{\circ}\text{C min}^{-1}$  (TOWILL; BONNART, 2003), facilitam a vitrificação intracelular enquanto o reaquecimento rápido reduz a possibilidade de recristalização do gelo intracelular, conduzindo assim a maior recuperação e sobrevivência (KIM *et al.*, 2006; PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005).

Como outras técnicas baseadas na vitrificação, a gota-vitrificação requer o uso de uma solução de vitrificação para a desidratação dos explantes. Os crioprotetores penetrantes e não penetrantes contidos na solução de vitrificação reduzem o teor de água congelável na célula, permitindo a vitrificação das células durante o resfriamento, por meio da proteção de estruturas celulares durante a criopreservação. As soluções de vitrificação, apesar de sua ação útil durante a criopreservação, são altamente tóxicas. Dessa forma, a composição da solução e a duração do tratamento devem ser cuidadosamente selecionadas dependendo do material vegetal (KIM *et al.*, 2009).

## **AGENTES CRIOPROTETORES**

Os crioprotetores podem ser definidos como substâncias químicas que reduzem a injúria sofrida pela célula, durante seu congelamento e descongelamento (EFENDI, 2003).

Agentes crioprotetores reduzem o estresse físico e químico derivado do congelamento e do degelo das células. As características físico-químicas ideais para um crioprotetor devem abranger baixo peso molecular, alta solubilidade em água e baixa toxicidade celular (LIMA, 2011).

As diferenças de permeabilidade dos crioprotetores afetam os mecanismos pelos quais ocorre a proteção ao material biológico. Os crioprotetores que apresentam permeabilidade efetiva são altamente hidrofílicos devido à presença de grupos químicos que formam pontes de hidrogênio com a água, como hidroxilas, amidas, sulfóxidos, carboxilas e aminas (NASH, 1966). Os crioprotetores podem ser classificados em dois tipos: penetrantes e não penetrantes, de acordo com a sua habilidade em atravessar as membranas celulares (MULDREW; MCGANN, 1999).

Os penetrantes conseguem ultrapassar a membrana plasmática e agem aumentando a viscosidade do meio intracelular. O dimetilsulfoxido (DMSO), o etilenoglicol e o propilenoglicol, são exemplos de crioprotetores penetrantes. Já os não penetrantes induzem a desidratação devido ao aumento da osmolaridade extracelular (MULDREW; MCGANN, 1999; BENSON, 2008). Como exemplo de crioprotetores não-penetrantes pode-se citar: a sacarose, a polivinilpirrolidona (PVP), o óxido de polietileno e o hidroxietilamido. O glicerol apresenta um comportamento peculiar, já que à temperatura ambiente, consegue penetrar as membranas, o que não ocorre quando usado a 0°C (MULDREW; MCGANN, 1999).

Os crioprotetores não penetrantes ou extracelulares são capazes de induzir o aumento da osmolaridade do meio externo, gerando a passagem da água do interior da célula para o meio extracelular, prevenindo a formação de cristais de gelo durante o congelamento. São particularmente apropriados à preservação de micro-organismos por se fixarem à superfície microbiana formando uma camada viscosa capaz de proteger mais efetivamente suas paredes celulares e membranas (MERYMAN, 1974; HUBÁLEK, 2003). Entre os crioprotetores penetrantes ou intracelulares destaca-se a propriedade de realizar ligações com as moléculas de água, minimizando a formação e o tamanho dos cristais de gelo, bem como, reduzindo as concentrações de soluto tanto no meio extracelular quanto no intracelular. Também se caracterizam por apresentarem baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e baixa toxicidade celular (NASH, 1966; HUBÁLEK, 2003).

Grandes avanços no campo da criopreservação foram permitidos a partir da descoberta das propriedades crioprotetoras do glicerol por Polge em 1949 (WOODS *et al.*, 2004). Gradativamente, várias substâncias foram adicionadas à lista de crioprotetores efetivos, como o dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol, metanol dentre outros (DAY & MCLELLAN, 1995).

Apesar dos crioprotetores serem essenciais para o congelamento seguro da maioria dos sistemas biológicos, essas substâncias não permitem a sobrevivência de todas as células, o que pode ser explicado por apresentarem efeitos tóxicos que dependem principalmente da concentração do crioprotetor utilizado bem como do tempo de exposição da célula ao mesmo (OLIVEIRA, 2003).

Essas substâncias crioprotetoras podem ser utilizadas isoladamente ou em combinação, compondo as chamadas soluções de vitrificação. Diversas soluções crioprotetoras já foram estabelecidas, dentre estas, destacam-se as Plant Vitrification Solutions (PVS) que contêm tanto substâncias penetrantes quanto não-penetrantes e diferem entre si de acordo com o tipo e a concentração de cada componente (BENSON, 2008) (Tabela 1).

Tabela 1 Composição de diferentes soluções de vitrificação.

Solução	Glicerol	Etilenoglicol	DMSO	Sacarose	Referência
PVS <sub>1</sub>	30%	15%	15%	5%	URAGAMI et al., 1989
PVS <sub>2</sub>	30%	15%	15%	0,4M	SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990
PVS <sub>3</sub>	50%	-	-	50%	NISHIZAWA et al., 1993
PVS <sub>4</sub>	35%	20%	-	0,6M	SAKAI, 2000
VSL	10%	10%	10%	45%	LIU; WANG; LIU, 2004

### Álcoois e Derivados

Na criomicrobiologia, o principal álcool utilizado com sucesso na preservação dos mais diversos micro-organismos é o glicerol. No entanto, os álcoois de açúcares, como o etilenoglicol e o polietilenoglicol, também podem ser utilizados (HUBÁLEK, 2003).

O glicerol é um álcool polihídrico altamente permeável com peso molecular 92,10 g mol<sup>-1</sup> (SILVA *et al.*, 2003). Sua atividade de crioproteção foi inicialmente aplicada em 1913, quando Keith observou que a sua adição em variadas concentrações (5-42%) em suspensão de *Escherichia coli* permitiu mantê-la viável por seis meses à temperatura de -20 °C. O glicerol penetra à membrana celular através da difusão passiva, permanecendo tanto na membrana quanto no citoplasma (PARKS & GRAHAM, 1992). Sua difusão é de 30 a 60 vezes mais lenta que a da água (GRAHAM, 1996). Os efeitos protetores do glicerol são representados por propriedades coligativas, diminuição do ponto de congelamento com conseqüente redução das concentrações de eletrólitos na fração não-congelada da amostra (LOVELOCK & POLGE, 1954).

O glicerol é o crioprotetor mais utilizado na preservação por congelamento. Antes dos anos 50 já se utilizava glicerol não-diluído ou na concentração de 50% para a preservação de bactérias e vírus em temperaturas entre -4 e -20 °C (KEITH, 1913; HUBÁLEK, 2003).

Por outro lado, alguns autores relataram que o glicerol pode exercer efeitos tóxicos sobre as células, como alterações físico-químicas que podem levar à ruptura da membrana plasmática, à remoção de importantes proteínas membranárias, bem como, induzir modificações na estabilidade da estrutura lipídica (WATSON, 1995; CURRY, 2000).

O etilenoglicol é um crioprotetor de baixo peso molecular (62,07 g/mol), que poderia apresentar uma baixa toxicidade e uma maior capacidade de penetração às células (SILVA, 2007). É utilizado como crioprotetor na concentração média de 10%, podendo variar de 2 a 40%.

## **Sacarose**

Alguns açúcares mostraram ser capazes de evitar os danos causados pela desidratação celular, devido ao processo de congelamento, através da estabilização da bicamada lipídica, promovendo alterações na permeabilidade e na separação lateral dos componentes da membrana plasmática. Acredita-se que alguns açúcares como a sacarose e a trealose estabilizem a bicamada de fosfolipídios, mantendo sua capacidade de transporte de cálcio, inibição da fusão de membranas e a manutenção dos lipídios numa fase fluida na ausência de água (CROWE *et al.*, 1987; WOELDERS *et al.*, 1997).

O modo de ação dos açúcares na aquisição da tolerância à desidratação e ao congelamento ainda não é totalmente conhecido e uma correlação direta não foi demonstrada, mas ele possivelmente envolve múltiplos componentes (SANTOS, 2001).

A sacarose tem sido frequentemente utilizada para a criopreservação de microorganismos em concentrações de 1-68% (média 10%). O efeito crioprotetor desse dissacarídeo foi descrito por Keith (1973), quando utilizou uma solução de cana de açúcar para a preservação de bactérias a -10 °C e as manteve por oito meses.

## **Sulfóxidos**

Os sulfóxidos são tioéteres oxidados contendo um átomo de oxigênio por molécula e, ao contrário dos outros tioéteres, são solúveis em água. A oxidação dos sulfóxidos resultam em sulfonas com dois átomos de oxigênio por molécula: a dimetilsulfona, que apresenta grande habilidade crioprotetora (MCGANN & WALTERSON, 1987).

O dimetilsulfóxido (DMSO) é um composto polar e que apresenta peso molecular 78.13 g/mol. Foi introduzido na criobiologia de forma muito eficaz e rapidamente foi utilizado como agente crioprotetor universal. O DMSO também apresenta propriedades radioprotetoras aos organismos. Classificado como sulfóxido, o grupamento S-O presente

em sua molécula é quimicamente inerte, e é caracterizado por sua elevada eficiência e rápida penetração celular. Os primeiros estudos mostrando a atividade crioprotetora do DMSO foram desenvolvidos com eritrócitos e espermatozóides e, gradualmente, essa substância foi utilizada na criopreservação dos mais diversos micro-organismos, tanto eucariotos como procariotos (MASSUMOTO, 1997; HUBÁLEK, 2003).

A literatura relata amplo uso do DMSO como crioprotetor em concentrações que variam de 1 a 32%. No entanto, devido a sua alta solubilidade em água, o DMSO apresenta como inconveniente a capacidade de causar alterações à membrana celular, as quais danificam e inviabilizam as células. E, assim, mesmo em concentrações muito baixas, pode ser tóxico a alguns sistemas biológicos, principalmente quando mantidos por longo período em temperaturas acima de 5 °C (HUBÁLEK, 2003).

### ***Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN**

A família Amaranthaceae é formada atualmente por 170 gêneros com cerca de 2000 espécies, ocorrendo nos trópicos, subtropicais e regiões temperadas da América e da África. No Brasil ocorrem vinte e sete gêneros e aproximadamente 158 espécies da família (MARCHIORETTO *et al.*, 2015). Alguns membros da família destacam-se pelo uso medicinal, como os gêneros *Pfaffia* (MONTANARI, *et al.*, 1999), *Gomphrena* (MERCIER *et al.*, 1992) e *Hebanthe* (VIGO *et al.*, 2004a). O gênero *Amaranthus* destaca-se pelas sementes, as quais possuem alto valor nutritivo (BENNICI *et al.*, 1997) e pelo uso como ornamental (CRONQUIST, 1981; MERCIER *et al.*, 1992).

Espécies do gênero *Pfaffia* são utilizadas na medicina popular, devido a suas propriedades químicas (MARTINS & NICOLOSO, 2004). Algumas como *P. iresinoides*, *P. glomerata*, *P. jubata*, *P. tuberosa* e *Hebanthe erianthos* já têm suas propriedades medicinais confirmadas com o isolamento de compostos bioativos de suas raízes (NAKAI *et al.*, 1984; NISHIMOTO *et al.*, 1984, 1986, 1987, 1988; SHIOBARA *et al.*, 1992, 1993).

Várias espécies como *P. glomerata* (Figura 1), *P. iresinoides* e *Hebanthe erianthos* são conhecidas como “ginseng-brasileiro” e têm sido utilizada como tônico e afrodisíaco, para o tratamento do diabetes, reumatismo (MAGALHÃES, 2000), esgotamento físico e mental, falta de memória e estresse (CORRÊA, 2014).



Figura 1 - *Pfaffia glomerata* em condições naturais de campo. Fonte: Daniela Oliveira. 2015.

*P. glomerata* é a espécie de maior importância medicinal e comercial (VIGO *et al.*, 2004; FIGUEIREDO *et al.*, 2004; ZIMMER *et al.*, 2006). Caracteriza-se por ser uma erva perene a subarbustiva relativamente alta (atingindo até dois metros de altura), apresenta caules retos, delgados e ocos quando adulto na parte superior (VASCONCELOS, 1986), raiz fusiforme e inflorescência (Figura 2) muito ramificada composta por flores hermafroditas (SMITH E DOWNS, 1972). Caracteriza-se pela grande adaptabilidade, alta variabilidade genética e pelo rápido crescimento (MAGALHÃES 2000; VIGO *at al.*, 2004). *P. glomerata* apresenta melhor desenvolvimento em regiões com temperaturas mais elevadas, mostrando-se sensível às geadas (MAGALHÃES, 2000). Suas raízes (Figura 3) são utilizadas com fins medicinais há séculos pelos nativos da Região Amazônica e regiões vizinhas (VIGO *et al.*, 2004).



Figura 2 - Inflorescências de *Pfaffia glomerata*. Fonte: Costa PPPR.



Figura 3 – Raiz de *Pfaffia glomerata*. Fonte: Revista Globo Rural.

*P. glomerata* possui caules eretos, roliços, estriados, muitas vezes ocos na parte superior, medindo de 0,5 até 2,5 m de altura, com nós engrossados e entrenós com até 0,23 m de comprimento; ramificações predominantemente dicotômicas, glabras ou pubescentes, principalmente nos ramos jovens e nós (VASCONCELOS, 1986). Possui crescimento anômalo tanto no caule como na raiz, o que resulta em crescimento em espessura notável na parte subterrânea; quando adultos, os caules geralmente são ocos na parte superior; as folhas são simples, inteiras, opostas; as lâminas têm forma e tamanhos variáveis, de linear oblonga até largo-ovaladas, de 1,0 a 14,0 cm de comprimento e 0,3 a 4,5 cm de largura;

quando novas, são largas e aquelas próximas das inflorescências são estreitas (LAWRENCE, 1985; POTT e POTT, 1994).

As inflorescências são capitulares, paleáceas, branco-amareladas. As flores são hermafroditas ou polígamo, em espigas subglobosas, com 4 a 8 mm de diâmetro (SMITH e DOWNS, 1972). Em revisão recente do gênero *Pfaffia* (MARCHIORETTO *et al.*, 2010) as flores são consideradas hermafroditas. A planta floresce e frutifica de setembro a maio e, às vezes, nos outros meses (POTT e POTT, 1994). Segundo Teske e Trentini (1995) *Pfaffia glomerata* possui em sua composição vitaminas A, B, C, D, E e K, sais minerais como fósforo, cálcio e potássio, aminoácidos e mucilagens. Os principais compostos isolados de *Pfaffia glomerata* os fáfiosídeos (saponinas nortriterpênicas derivadas do ácido fático) e os ecdisteróides, em especial a ecdisterona, rubrosterona, ácido oleanólico e B-glicopiranosil (SHIOBARA *et al.*, 1993; DE-PARIS *et al.*, 2000; VIGO *et al.*, 2003).

*P. glomerata* tem como propriedade terapêutica efeitos antitumorais, afrodisíacos, antidiabéticos e tônicos em geral (MONTANARI JÚNIOR *et al.*, 1997), atuando ainda como antiinflamatória, imunoestimulante, leucocitogênica, cicatrizante interna e externa, febrífuga (CHISAKI *et al.*, 1998), energizante e reconstituente da atividade sexual (TEIXEIRA *et al.*, 2001). Taylor (1978) cita que foi também chamada de "segredo russo" em função do uso, pelos atletas olímpicos russos, no aumento da massa muscular e da resistência física, as quais eram promovidas pela B-ecdisona, substância de propriedade anabólica sem os efeitos colaterais dos esteróides sintéticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, R. B. N., Caracterização morfológica, química e conservação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen. – Botucatu: [s.n.], 2008. 129f. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP - Botucatu, 2008.

ARIKAT, N.A. *et al.* Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticulosa* Mill.). **Scientia Horticulturae**, v. 100, p. 193-202, 2004.

BAJAJ YPS (1995) Cryopreservation of plant cell, tissue, and organculture for the conservation of germplasm and biodiversity. In: Bajaj YPS, ed, **Biotechnology in**

**agriculture and forestry**, vol. 32, Cryopreservation of plant germplasm I. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 3-28.

BENNICI, A. *et al.* Studies on callus growth and morphogenesis in several species and lines of *Amaranthus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.49, p. 29-33, 1997.

BENSON, E. E. Criopreservation theory. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant cryopreservation: a practical guide**. Corvallis: Springer, 2008.

BOTTA, B. et al. Cultura de Tecidos Vegetais: doze anos de experiência. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001. p. 354-379.

BRISON, M.; BOUCAUD, M.T. de; PIERRONNET, A.; DOSBA, F. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv. Of *Prunus* rootstock experimentally infected with Plum Pox Potyvirus. **Plant Science**, Limerick, v. 123, p. 189-196,1997.

CHISAKI, K.C.L.; SILVA, F.S.B.; JUNIOR, M.V.A.; ALBUQUERQUE, U.P.; SILVA, F.C.L. Morfodiagnose dos órgãos aéreos do acônito (*Pfaffia glomerata* [Spreng.] Peders.). In: XV Simpósio Brasileiro de Plantas Medicinais do Brasil. **Anais...Águas de Lindóia – SP. 1998**

CORRÊA JÚNIOR, C. **Estudo agrônômico de [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]: sazonalidade na produção de raízes e conteúdos de  $\beta$ -ecdisona em diferentes acessos de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul**. 2003. 94f. Tese (Doutorado em Agronomia/ Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

CORRÊA, W.R. **Prospecção de substâncias bioativas em *Pfaffia townsendii* e *Pfaffia tuberosa* (Gamphereneae, Amaranthaceae)**. Tese de Doutorado. Unicamp. 2014. Instituto de Biologia.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

CROWE, J. H., B. J. SPARGO, and L. M. CROWE. 1987b. Preservation of dry liposomes does not require retention of residual water. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 84:1537–1540. [\[PMC free article\]](#)[\[PubMed\]](#)

CURRY, M. R. Cryopreservation of semen from domestic livestock, **Rev. Reprod.**, v. 5, p. 46-52, 2000.

DAY, J. G., and M. R. MCLELLAN (ed.). 1995. **Cryopreservation and freeze-drying protocols.** Humana Press, Inc., Totowa, N. J.

DE PARIS, F.; SALGUEIRO, J. B.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I.; RATES, S. M. K. Psychopharmacological screening of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen (Amaranthaceae) in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 261-269, 2000.

ENGELMANN, F. Plant criopreservation: progress and prospects. *In vitro Cellular Developmental Biology*, **Plant**, New York, v. 40, p. 427-433, 2004.

ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. **Plant Genetic Resources Newsletter** 112: 9-18. (1997)

FAHY, G.M.; MACFARLANE, D.R.; ANGELL, C.A.; MERYMAN, H.T. (1984) Vitrification as an approach for cryopreservation. *Cryobiology* 21:407–426 Franks F (1982) The properties of aqueous solutions at subzero temperatures. In F Franks, ed., **Water: a comprehensive treatise**, Plenum Press, New York, pp. 215-218.

FALEIRO, J.R., EL-SAAD, M.A., AL-ABBAD, A.H., 2011. Pheromone trap density to mass trap *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae/Rhynchophoridae/Dryophthoridae) in date plantations of Saudi Arabia. **Int. J. Trop. Plant Sci.** 31, 75e77

FERREIRA, M. A.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A.

**Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH. v. 1, p. 21- 43, 1998.

FIGUEIREDO, M. do A.; VARAJÃO, A.F.D.C.; FABRIS, J.D.; LOUTFI, I.S.; CARVALHO, A.P. Alteração superficial e pedogeomorfologia no Sul do Complexo Baçã - Quadrilátero Ferrífero (MG). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, p.713-729, 2004

FRANKS, F. The properties of aqueous solutions at subzero temperatures. In: Franks, F. (Ed.) **Water: a comprehensive treatise**. New York, Plenum Press, 1982. pp. 215-218.

GAHAN, P.B.; GEORGE, E.F. Adventitious regeneration. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G.-J. **Plant propagation by tissue culture**, Springer, Dordrech, The Netherlands, 2008. p. 1-28. v.1.

GEORGE, E.F. Plant tissue procedure: background. In: GEORGE, E.V.; HALL, M.A.; DE KLERK, G.-J. **Plant propagation by tissue culture**. Springer, Dordrech, The Netherlands. 2008. p. 1-28.v.1.

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

GRAHAM, J.K. Veterinary clinical of North American: equine practice. **Cryopreservation of Stallion Spermatozoa**, v.12, p.131-147, 1996.

HABERLANDT, G. Kulturversuche mit isolierten pflanzenzellen. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien., Math.-Naturwiss. **K.L.Abt**, v.1, 111. p. 69-92, 1902.

HELLIOT, B.; PANIS, B.; POUMAY, Y.; SWENNEN, R.; LEPOIVRE, P.; FRISON, E. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa spp.*). **Plant Cell Reports**, New York, v. 20, p. 1117-1122, 2002.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Paulo: EDUFSCAR. 2003.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology** 46 (3): 205-229. 2003.

KEITH, S.C. Factors influencing the survival of bacteria at temperatures in the vicinity of the freezing point of water, **Science**. 37:877-879. 1913.

KIM, H. H. et al. Cryopreservation of garlic bulbil primordia by the droplet-vitrification procedure. **Cryo-Letters**, Cambridge, v. 27, n. 3, p. 143-153, May 2006.

KIM, H. H. et al. Development of alternative plant vitrification solutions in droplet-vitrification procedures. **Cryo-Letters**, Cambridge, v. 30, n. 5, p. 320-334, Sept./Oct. 2009.

KOSTER, K.L. Glass Formation and Desiccation Tolerance in Seeds. **Plant Physiol**. v. 96, 302-304, 1991.

ISLAM, M.R.; DAS, B.C.; HOSSAIN, K.H.; LUCKY, N.S.; MOSTAFA, M.G. A study on the occurrence of poultry disease in Sylhet Region of Bangladesh. **International Journal of Poultry Science** 2 354-356. 2003.

LAWRENCE, T.L.J. Processing and preparation of cereals for pig diets. In: COLE, D.J.A., HARESIGN, W. (Eds.) **Recent developments in pig nutrition**. London: Butterworths. p. 230-45. 1985.

LEUNUFNA, S.; KELLER, E. R. J. Investigating a new cryopreservation protocol for yams (*Dioscorea* spp.) **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, n. 12, p. 1159-1166, Aug. 2003.

LOVELOCK, J.E.; POLGE, C. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. **Biochemic Journal**, v. 58, p. 618-622, 1954.

MAGALHÃES, P.M. Agrotecnologia para el cultivo de fafia "ginseng brasileiro". In: Fundamentos de agrotecnologia de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas. **Anais..** Bogotá: CYTED, 2000.

MARCHIORETTO, M.S.; SENNA, L.; SIQUEIRA, J.C. 2015. Amaranthaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.** Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jobot/floradobrasil/FB42>>

MARTINS, C.F; NICOLOSO, F.T. Micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.6, n.3, p.53-61, 2004.

MASSUMOTO, C.M. *et al.* Criopreservação de medula óssea e células pluripotentes periféricas utilizando um congelador programável: experiência em 86 congelamentos. **Rev. Assoc. Med. Bras.** [online]. 1997, vol.43, n.2

MATTOS, P.P.; SALIS, S.M. Resultados Preliminares do Plantio do Ginseng-do-Pantanal (*Pfaffia glomerata*) no Pantanal. **Comunicado Técnico 49.** ISSN 1517-4875. Dezembro, 2005. Corumbá-MS.

MERCIER, H.; VIEIRA,C.C.J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Tissue culture and plant propagation of *Gomphrena officinalis* - a Brazilian medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 28, p. 249-254, 1992.

MERYMAN, H. T. (1974) Freezing injury and its prevention in living cells. **Annual Review of Biophysics and Bioengineering** 3, 341-363.

MIAJA, M. L.; GRIBAUDO, I.; VALLANIA, R.; FERNANDEZ, L.F. Low temperature storage and cryopreservation of a *Vitis vinífera* I. germplasm collection: first results. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 538, p. m 177-181, 2000.

MONTANARI JÚNIOR, I.; MAGALHÃES, P.; QUEIROGA, C. L. Influence of plantation density and cultivation cycle in rot productivity and tenors of becdisone in *Pffafia glomerata* (Spreng) Pederson. In: WORLD CONGRESS ON

MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS FOR HUMAN WELFARE, 2., 1997, Mendoza.  
**Abstracts** Mendoza: [s.n.], 1997.

MONTANARI JÚNIOR, I. **Aspectos da produção comercial de plantas medicinais nativas**. Campinas: CPQBA-UNICAMP, 2002. 7p.

MONTANARI, J.I.; MAGALHÃES, P.M.; QUEIROGA, C.L. Influence of plantation density and cultivation cycle in root productivity and tenors of beta ecdisone in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Acta horticultrae**, v. 3, n. 502, p. 125-129, 1999.

MULDREW, K.; MCGANN, L.E. *Cryobiology: a short course*, 1999. Acessado em Setembro de 2014. Disponível em:  
[people.ucalgary.ca/~kmuldrew/cryo\\_course/course\\_outline.html](http://people.ucalgary.ca/~kmuldrew/cryo_course/course_outline.html)

NAKAI, S.; TAKAGI, N.; MIICH, H.; HAYASHI, S.; NISHIMOTO, N.; TAKEMOTO, T.; KIZU, H. Pfaffosides, nortriterpenoid saponins, from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, v.23, p.1703-1705, 1984.

NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. **Cryobiology**, New York, p.179-220, 1966.

NISHIMOTO, N.; NAKAI, S.; TAKAGI, N.; HAYASHI, S.; TAKEMOTO, T.; ODASHIMA, S.; KIZU, H.; WADA, Y. Pfaffosides and Nortriterpenoid Saponis from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 139-142, 1984.

NISHIMOTO, N et al. Ecdisterone from *Pfaffia tuberosa* (Spreng) Hicken. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.1, p. 188-191, 1986.

NISHIMOTO, N. et al. Ecdysteroids from *Pfaffia iresinoides* and reassignment of some CNMR chemical shifts. **Phytochemistry**, v. 26, n.9, p. 2505-2507, 1987.

NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, Y.; INOUE, S-S.; FUJINO, M.; TAKEMOTO, T.; YEOH, C. L.; OLIVEIRA, F. de; AKISUE, G.; AKISUE, M. K.; HASHIMOTO, G. Three ecdysteroid glycosides from *Pfaffia iresinoides*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 1665-1668, 1988.

OLIVEIRA, E.C.S. **Efeito de diferentes diluidores sobre a criopreservação do sêmen canino**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003. MG.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In.: Exploring and protecting agricultural genetic resources. **Abstract**...Rome: FAO, p.61-78, 2006.

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

PARKS E.J.; GRAHAM J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranas. **Theriogenology**, v.38, p.209-222, 1992.

PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 4, ano 1, jan/fev., 1998.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. **Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures**, *Nature*, 164, 666 (1949).

POTT, A.; POTT, V.J. **Plantas do Pantanal**. Brasília: Embrapa, 1994. 320 p. il.

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

RATES, S.M.K.; GOSMANN, G. Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para o seu emprego terapêutico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, n.2, p.85-93, 2002.

RAZDAN, M.K. 2003. **Plant Tissue Culture**. 2ed. Science Publishers, Enfield, NH, USA.

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: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 107-111, Jan. 2008.

SANTOS, I.R.I; STUSHNOFF, C. Desiccation and freezing tolerance of embryonic axes from *Citrus sinensis* (L.) Osb. Pretreated with sucrose. **CryoLetters**, c/o Royal Veterinary College, London, v. 24, p. 281-292, 2003.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação de Germoplasma Vegetal: a alternativa para a conservação a longo prazo. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** - nº 20 - maio/junho 2001.

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

SHIOBARA, Y.; INOUE, S-S.; NISHIGUCHI, Y.; KATO, K.; TAKEMOTO, T.; NISHIMOTO, N.; OLIVEIRA, F. de; AKISUE, M. K.; HASHIMOTO, G. PFaffane-type nortriterpenoids from *Pfaffia pulvurulenta*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 1737-1740, 1992.

SHIOBARA, Y., INOUE, S., KATO, K., *et al.* A nortriterpenoid, triterpenoid and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, Oxford, v.32, n.6, p.1527-1530, 1993.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. **Theriogenology**, v. 59, p. 821-829, 2003.

SILVA, A.R. Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.1, p.119-127, 2007.

SMITH LB; DOWNS RJ. 1972. **Flora Ilustrada Catarinense: Amarantaceas**. Itajaí. 110 p.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Plantarum, Nova Odessa. 2005.

STANWOOD, P.C. and BASS, L.N. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. **Seed Science and Technology**, 9:423-437. 1981.

TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. **Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species)**. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1978, 111p.

TEIXEIRA, M. R.; TSAROUHA, H.; KRAGGERUD, S. M.; PANDIS, N.; DIMITRIADIS, E.; ANDERSEN, J. A., *et al.* (2001): Evaluation of breast cancer polyclonality by combined chromosome banding and comparative genomic hybridization analysis. **Neoplasia** 3: 204-214.

TOUCHELL, D.H.; CHIANG, V.L.; TSAI, C.-J. Cryopreservation of embryogenic cultures of *Picea mariana* (black spruce) using vitrification. **Plant Cell Rep**, 2002. 21: 118-124.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Herbarium compêndio de fitoterapia**. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1995. p. 69-71.

VALOIS, A. C. C.; NASS, L. L.; GOES, M. Conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. DE; VALADARES-INGLIS, M.A. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 29-55.

VASCONCELLOS, J.M. DE O. - Amaranthaceae do Rio Grande do Sul, V - Gêneros de *Pfaffia* Mart. e *Gomphrena* L. **Roessléria** 8(2): 75-94, 1986.

VIGO, C.L.S. *et al.* Influências da variação sazonal e tipos de secagem nas características da droga vegetal - raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pederson (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n.2, p. 137-144, 2004.

WALTHER, G.R.; BERGER, S.; SYKES, M.T. 2005 *b*An ecological ‘footprint’ of climate change. **Proc. R. Soc. B** 272, 1427–1432. (doi:10.1098/rspb.2005.3119)

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assesment of their postthawing function. **Reproduction Fertility and Development**, v.7, p.871-91, 1995

WETZEL, M.M.VS.; REIS, R.B.; RAMOS, K.M. Metodologia para Criopreservação de sementes de Espécies Florestais Nativas. **Circular Técnica**, 26. EMBRAPA, 2003.

WITHERS, L.A.; ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of plant genetic resources. In.: ALTMAN, A. COLWELL, R.R. (Ed.). **Agricultural biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 57-88.

WOODS, E.J., BENSON. J.D., AGCA, Y., CRITSER, J.K. 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. **Cryobiol.** 48:146-156.

ZIMMER, j. LI. W.; and RAPOPORT, T. A. (2006). A novel dimer interface and conformational changes revealed by an X-ray structure of *B. subtilis* SecA. **J Mol Biol** 364, 259-265.

# CAPÍTULO I - DESENVOLVIMENTO DE UM PROCEDIMENTO SIMPLIFICADO PARA INTRODUÇÃO E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN.

## RESUMO

*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen é uma espécie nativa com propriedades medicinais, conhecida popularmente como ginseng brasileiro, altamente explorada de forma predatória. O objetivo desse trabalho foi estabelecer uma técnica simplificada para a introdução e multiplicação clonal *in vitro* de *P. glomerata*. Segmentos nodais (SN) foram coletados de plantas do genótipo (2209-09/CCQ 58) em crescimento na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília-DF e submetidos a dois tratamentos de descontaminação e cultivados *in vitro* em meio de cultura MS básico, sem adição de reguladores de crescimento, solidificado com ágar (0,7%). A descontaminação foi feita utilizando uma solução contendo hipoclorito de sódio, “Tween 80” e estreptomicina (tratamento 1), ou apenas a estreptomicina (tratamento 2). Após cada tratamento os SN foram inoculados *in vitro* e as culturas foram mantidas em sala de crescimento a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas de luz, e intensidade luminosa de  $40 \mu\text{m}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas. Plântulas normais com parte aérea e sistema radicular bem desenvolvidos foram produzidas após trinta dias de cultivo *in vitro*. Os percentuais de regeneração foram de 92% para os SN submetidos ao tratamento 1 e de 80% para aqueles submetidos ao tratamento 2. A multiplicação *in vitro* foi realizada por subcultivo de ápices caulinares e SN coletados das plântulas obtidas *in vitro* em meio de cultura MS básico. O procedimento descrito é bastante simples e permite a introdução e multiplicação *in vitro* de *P. glomerata* para sua propagação clonal, conservação *ex situ* do seu germoplasma ou para a produção de estoques de plântulas para estudos diversos.

Palavras-chave: Conservação; ginseng-brasileiro; germoplasma; plantas medicinais; *Pfaffia*.

## 1.1. INTRODUÇÃO

*Pffafia glomerata* (Spreng) Pedersen, (Amaranthaceae), é uma espécie nativa de amplo uso popular, submetida a uma alta pressão antrópica devido ao extrativismo (Vieira et al., 2002). Conhecida como fáfia ou ginseng-brasileiro suas substâncias medicinais foram identificadas como características de efeito adaptógeno (NISHIMOTO *et al.*, 1987 e SHIOBARA *et al.*, 1992). Existe uma grande demanda mundial pelas raízes desta planta, principalmente pelo Japão, onde a espécie foi bastante estudada sob o ponto de vista fitoquímico e farmacológico (NISHIMOTO *et al.*, 1987; NISHIMOTO, 1990; NISHIMOTO, 1992 e SHIOBARA *et al.*, 1992). Segundo Alcântara (1994), o procedimento extrativista intensificado a partir da validação científica de suas propriedades terapêuticas, tem reduzido a variabilidade das populações e conseqüentemente o fornecimento de matéria prima, além de causar prejuízos ao meio ambiente.

A cultura de tecidos vegetais abrange diversas técnicas que se baseiam no cultivo *in vitro* em meio de cultura apropriado e sob condições assépticas de pequenos propágulos vegetais isolados da planta matriz, denominados explantes (GEORGE; HALL; KLERK, 2008b). Esta técnica fundamenta-se na totipotência da célula vegetal, princípio pelo qual ela pode ser induzida a voltar ao estado meristemático, redefinir seu padrão de diferenciação celular e, dessa forma, dar origem a novos órgãos, embriões ou a uma planta completa (TERMIGNONI, 2005).

Dentre as vantagens da introdução e multiplicação *in vitro*, destacam-se a manutenção dos genótipos em condições assépticas, a redução nos custos e mão-de-obra, a otimização do espaço físico, além da facilidade de intercâmbio do material vegetal (ENGELMANN, 2011). Devido a técnica da micropropagação proporcionar um ambiente favorável ao crescimento de microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, o princípio básico para o sucesso da cultura de tecidos é, em parte, medidas de prevenção e controle da contaminação microbiana (PEREIRA *et al.*, 2011). Na fase de estabelecimento *in vitro*, dependendo da origem do material a contaminação pode comprometer o trabalho de micropropagação (PEREIRA *et al.*, 2015).

O objetivo desse estudo foi estabelecer uma técnica simplificada para a introdução e multiplicação *in vitro* de *Pffafia glomerata*, para a produção de estoques plântulas para usos diversos.

## **1.2 METODOLOGIA**

### **1.2.1 Material vegetal**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Criobiologia Vegetal (LCV) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa Cenargen), localizada em Brasília – DF. O material vegetal utilizado neste estudo foram segmentos nodais (SN) de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (acesso 2209-09/CCQ58) coletados de mudas plantadas em sacos de polietileno contendo substrato esterilizado em autoclave, composto de terra vermelha (Latossolo Vermelho-Amarelo), areia, esterco, calcário e adubo (Super Simples) e cultivadas por 30 dias em condições de temperatura e iluminação naturais.

### **1.2.2 Descontaminação**

Ramos foram coletados das plantas a cerca de 20 cm do solo, colocados em frasco contendo água destilada e levados ao LCV para descontaminação e introdução *in vitro*. SN com 1,0 cm de comprimento foram isolados desses ramos, lavados em água corrente e submetidos a dois tratamentos de descontaminação. Os tratamentos de descontaminação foram realizados em cabine de fluxo laminar, em condição asséptica. No tratamento 1 os SN foram transferidos para frasco contendo solução comercial de hipoclorito de sódio (2,0-2,5% de cloro ativo) contendo 5-8 gotas de Tween 20 (Sigma-Aldrich) por 5 minutos. Esta solução foi drenada do frasco e em seguida 30 ml de uma solução do antibiótico estreptomicina à concentração de 0,45g/50ml foi adicionada ao frasco e mantida por 5 minutos. No tratamento 2 os SN foram lavados em água corrente e transferidos para frasco contendo 30 ml de solução 0,45g/50ml do antibiótico estreptomicina, por 5 minutos. Após os tratamentos de descontaminação os SN foram enxaguados três vezes com água destilada esterilizada e em seguida foram colocados em placa de Petri contendo papel filtro esterilizado umedecido com 3,0 ml de água destilada e autoclavada. Cada um dos testes de descontaminação foram conduzidos com seis repetições de 10 SN, totalizando 60 SN por tratamento.

### 1.2.3 Introdução e multiplicação *in vitro*

Após os tratamentos de descontaminação, os segmentos nodais foram inoculados individualmente em tubos de ensaio (25 mm de largura, 150 mm de altura, 147,26 cm<sup>3</sup> de volume interno) contendo 10 ml de meio MS básico (MURASHIGUE E SKOOG, 1962), com pH ajustado para 5,8 antes da adição de 7,0 g/L de ágar e da esterilização em autoclave (1,5 atm, 120°C, 15 min.). O cultivo dos SN foi feito em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de 40 µm.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas. Após 60 dias de cultivo *in vitro* as plântulas obtidas foram utilizadas como doadoras de SN para o teste de multiplicação clonal. Para tanto, SN foram isolados das plântulas e transferidos para tubos de ensaio contendo o meio de cultura MS na composição descrita acima e as culturas foram mantidas em sala de crescimento nas condições de cultivo também descritas acima.

### 1.2.4 Análise estatística

A análise estatística dos percentuais de regeneração obtidos em resposta aos tratamentos de descontaminação e a introdução e multiplicação *in vitro* foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida de comparação entre as médias pelo Teste de Tukey, a 1% de significância. Todos os dados estatísticos foram analisados usando o Programa Estatístico GENES (CRUZ 2013).

## 1.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1.1 mostra o aspecto das plantas de *P. glomerata* usadas como doadoras de explantes. Estas plantas foram cultivadas em sacos contendo substrato composto de terra, areia, esterco, calcário e adubo, em condições de temperatura e iluminação naturais, por 30 dias. Essas plantas apresentaram-se vigorosas, saudáveis e sem anomalias. Após 30 dias, segmentos caulinares contendo os nós s foram coletados para a introdução *in vitro*. A

Figura 1.2 mostra os segmentos caulinares de plantas adultas de fáfia, dos quais foram obtidos os segmentos nodais.



Figura 1.1 - *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen: mudas estabelecidas em terra. Foto: Daniela Oliveira, 2014.

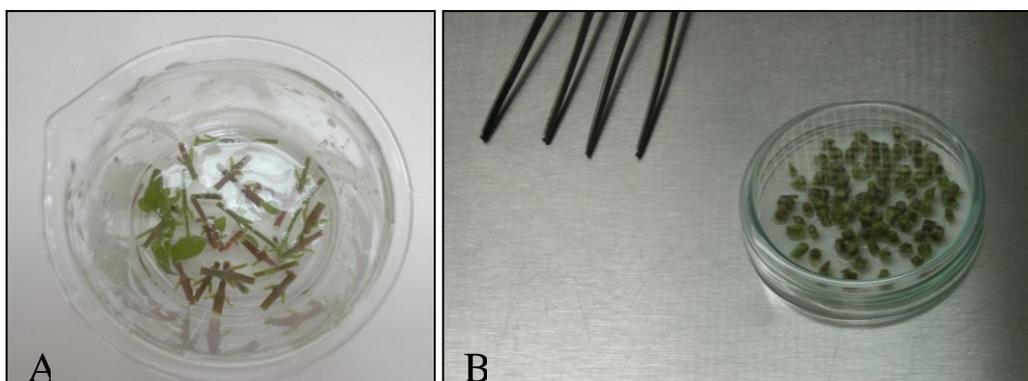


Figura 1.2 Parte de ramos (A) e segmentos nodais (B) obtidos de plantas adultas de *Pfaffia glomerata*. (Spreng) Pedersen. (Foto: Daniela Oliveira, 2014).

A figura 1.3 mostra o aspecto das plântulas obtidas a partir de segmentos nodais, após o cultivo *in vitro*. As culturas foram observadas diariamente para detectar contaminação e a resposta de regeneração dos explantes. A regeneração dos explantes foi acompanhada até 30 dias após a introdução *in vitro*. Depois de 30 dias de cultivo, as plântulas obtidas foram multiplicadas por subcultivo de seus segmentos nodais, e as plântulas regeneradas desses explantes pode ser vista na figura 3B.



Figura 1. 3 - Aspecto de plântulas obtidas a partir de segmentos nodais de *P. glomerata* após cultivo *in vitro* em meio de cultura MS básico, suplementado com 30,0 g/l de sacarose e solidificado com 7,0 g/l de ágar, por 30 dias. (Foto: Daniela Oliveira, 2014). (A) Plântulas com 15 dias *in vitro* (B) Plântulas com 30 dias *in vitro*.

Com relação aos tratamentos de descontaminação dos segmentos nodais introduzidos *in vitro*, observou-se que o tratamento 1, em que a descontaminação foi feita com hipoclorito e antibiótico, Tween 20 e estreptomicina, houve uma sobrevivência de 92% dos explantes. Os explantes que não sobreviveram apresentaram contaminação por bactérias e fungos. No tratamento 2, que corresponde a descontaminação somente com antibiótico estreptomicina, 80% dos explantes sobreviveram, enquanto que 20% apresentaram-se mortos e, igualmente contaminados por bactéria, ao fim do experimento (Tabela 1). Não houve diferença significativa entre as médias de sobrevivência após os dois tratamentos. Entretanto, o percentual médio de sobrevivência foi superior ao se utilizar hipoclorito de sódio (Tabela 1.1). Estudos realizados para a espécie *P. glomerata* por Nicoloso *et al.* (2001) mostraram resultados semelhantes, em que após a etapa de descontaminação, a presença de bactérias como contaminantes dos explantes, não ultrapassou 5% dos casos; sendo o melhor tratamento de desinfestação obtido para segmentos nodais e de entrenó foi imersão em  $HgCl_2$ , de no máximo 20% até 4 min.

A importância do tratamento de descontaminação e dos componentes utilizados foi enfatizada em estudos realizados com outras espécies de plantas. Souza *et al.* (2006) verificaram que explantes caulinares de goiabeira serrana (*Acca sellowiana*) e de pitangueira (*Eugenia uniflora L.*) podem ser descontaminados usando a concentração de hipoclorito de sódio entre 1,5% a 2,5%, por 10 minutos de exposição nesse agente

descontaminante. Lima & Moraes (2006) constataram que a imersão de explantes de bananeira apenas em solução de hipoclorito de sódio não mostrou diferenças significativas sobre a contaminação bacteriana. Justificaram a baixa eficiência do agente descontaminante por sua ação superficial no tecido vegetal. Pereira *et al.* (2015) obtiveram resultados semelhantes aos desse trabalho, no enraizamento *in vitro* do abacaxizeiro. Ao descontaminar os explantes com hipoclorito de sódio na concentração de 2,0% de cloro ativo verificou-se uma taxa de 8% de contaminação por bactérias. Em contraste, o tratamento sem hipoclorito de sódio a contaminação foi de 90,6%. Chaves *et al.* (2004) observaram que o hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,5%; 1,0%; 1,5% e 2,0% foi eficiente na descontaminação de explantes de *Prunus*. Explantes tratados com hipoclorito de sódio atingiram maiores porcentagens de sobrevivência (96,25%). Entretanto, somente 67,25% dos explantes se estabeleceram no meio de cultura. Oliveira & Nino (2009) utilizaram o hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos na desinfestação *in vitro* de quatro cultivares de framboeseira (*Rubus ideaus* L.), e observaram que na fase de estabelecimento *in vitro*, as cultivares Autumn Bliss e Heritage apresentaram as maiores porcentagens de explantes vivos, respectivamente de 97% e 84%.

Portanto, para *P. glomerata*, o melhor resultado de regeneração de plântulas saudáveis *in vitro* é a combinação de hipoclorito de sódio e o detergente Tween potencializando o antibiótico estreptomicina.

Tabela 1.1. Percentuais de regeneração de segmentos nodais de *P. glomerata* (acesso 2209-09/CCQ58) submetidos a dois tratamentos de descontaminação antes de sua introdução e cultivo *in vitro* em meio de cultura MS básico, suplementado com 30,0 g/l de sacarose e solidificado com 7,0 g/l de ágar, por 30 dias.

Tratamentos	Regeneração por repetição (%)						Regeneração média por tratamento (%) <sup>*</sup>
	I	II	III	IV	V	VI	
1 <sup>a</sup>	100	100	90	80	90	90	92 <sup>a</sup>
2 <sup>b</sup>	90	80	80	70	80	80	80 <sup>a</sup>

<sup>\*</sup>Médias de regeneração seguidas de letras minúsculas iguais nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade de erro. <sup>a</sup>Solução 2,0-2,5% de hipoclorito de sódio, 5-8 gotas de Tween 20 e 9,0mg/ml de estreptomicina. <sup>b</sup>Solução 9,0mg/ml de estreptomicina.

No presente trabalho, segmentos nodais cultivados *in vitro* em meio de cultura MS sem adição e reguladores de crescimento, contendo 30 g/l de sacarose, apresentaram altas taxas de regeneração (Tabela 1) e deram origem a plântulas vigorosas, com morfologia

normal (Figura 3). O procedimento testado neste estudo é muito simples e de fácil reprodução. Procedimentos simplificados são ideais para a introdução e multiplicação *in vitro* de germoplasma de interesse para uso em programas de conservação de recursos genéticos vegetais.

O meio de cultura utilizado no presente trabalho, o MS básico (MURASHIGUE E SKOOG, 1962), com 30 g/l de sacarose, pH ajustado para 5,8 antes da adição de 7,0 g/L de ágar e da esterilização em autoclave (1,5 atm, 120°C, 15 min.) foi suficiente para induzir altas taxas de regeneração de plântulas de *P. glomerata*.

Vários trabalhos de pesquisa conduzidas com *P. glomerata* relatam viabilidade de produzir plantas homogêneas e de qualidade através da micropropagação de segmentos nodais em meio MS (FLORES *et al.*, 2009; MALDANER *et al.*, 2006; NICOLOSO *et al.*, 2001; NICOLOSO *et al.*, 2003). Nicoloso *et al.* (2001 e 2003) realizaram estudos sobre as condições ideais para a micropropagação de *P. glomerata*, incluindo tratamentos para descontaminação e o efeito da concentração de macronutrientes, de carvão ativado e de carboidrato no meio de cultura MS, sobre o crescimento de segmentos nodais cultivadas *in vitro*, concluindo que os melhores resultados foram obtidos com o cultivo em meio de cultura MS com a concentração normal de macronutrientes e que a melhor fonte de carbono é a sacarose. Em 2006, Maldaner *et al.* confirmou que para a espécie *P. glomerata* a redução da concentração de N para 50% daquela padrão do meio MS, associada a um incremento na dose de sacarose para 45g L<sup>-1</sup>, favorece o crescimento em altura, número de segmentos nodais e brotações, bem como a produção de biomassa de *P. glomerata* cultivada *in vitro*. Flores *et al.* (2009) estudaram o efeito da BAP (6-benzilaminopurina) e do TDZ (thidiazuron) na propagação *in vitro* de segmentos caulinares de dois acessos de *P. glomerata*. O TDZ (1 µM) apresentou efeito positivo sobre a taxa de multiplicação e o desenvolvimento das plântulas para apenas um dos acessos (acesso JB-UFSM). Mas, no geral, o cultivo de segmentos nodais em meio de cultura sem adição de citocininas mostrou ser o método mais eficiente para a multiplicação *in vitro* de segmentos nodais dessa espécie e a produção de um grande número de plantas com alta qualidade.

Esses estudos realizados previamente, relatam procedimentos mais complexos em que a regeneração de novos brotos depende da suplementação do meio de cultura com de reguladores de crescimento ou outras substâncias indutoras. Do ponto de vista prático, este tipo de procedimento apresenta alguns inconvenientes, podendo-se citar como mais relevantes o aumento do custo de produção de mudas e o risco de indução de variação

somaclonal. Variação somaclonal é um dos maiores problemas encontrados na propagação clonal por meio do cultivo *in vitro*, e uma das recomendações para evita-la é a utilização de técnicas de micropropagação simplificadas, priorizando a regeneração direta em meios de cultura sem adição de reguladores de crescimento, ou se a adição dos mesmos for indispensável que as concentrações utilizadas sejam muito baixas (BAIRU *et al.* 2011; KONAN *et al.* 2010).

A proposta do presente trabalho foi desenvolver um procedimento simplificado para facilitar a produção de grandes quantidades de plântulas de *P. glomerata in vitro* para a propagação clonal via produção de mudas *in vitro* ou para uso em atividades de pesquisa diversas.

## 1.4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam que o estabelecimento e multiplicação clonal *in vitro* de *P. glomerata* podem ser realizados pelo cultivo de segmentos nodais em meio MS básico, sem adição de reguladores de crescimento, resultando em altos percentuais de regeneração de plântulas. As plântulas obtidas por meio deste procedimento são vigorosas, apresentando parte aérea e sistema radicular bem desenvolvidos, de aspecto normal. Estas plântulas podem ser multiplicadas para a produção de grandes números de indivíduos por meio do subcultivo de segmentos nodais.

O tratamento dos segmentos nodais com uma solução de hipoclorito de sódio (2,0-2,5% de cloro ativo), Tween 20 (5-8 gotas) e estreptomicina (0,45g/50ml) é essencial para a descontaminação dos explantes antes da introdução *in vitro*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÂNTARA M. F. A. Atividade antimicrobiana de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. In: XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. **Anais**, Fortaleza - CE. 1994. p 072.

BAIRU, M.W.; AREMU, A.O.; STADEN, J.V. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regul** 63: 147-173.

CHAVES, A.C.; SCHUCH, M.; WALMOR, B. 2004. Desinfestação de explantes de *Prunus* cv. Mr. S. 2/5 com hipoclorito de sódio e cálcio. **Revista Brasileira de Agrociência** 10: 249-250.

COSTA A.S.; ARRIGONI-BLANK M.F.; BLANK A.F.; MENDONÇA A.B.; AMANCIO V.F.; LEDO A.S. 2007. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira** 25: 68-72.

ENGELMANN, F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro Cellular & Development Biology — Plant** 47: 5-16.

FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; MALDANER, J.; GARLET, T.M.B. Benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.3, p.292-299, 2009.

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

KONAN, K.E.; DURAND-GASSELIN, T.; KOUADIO, Y.J.; FLORI, A.; RIVAL, A.; DUVAL, Y.; PANNETIER, C. 2010. *In vitro* conservation of oil palm somatic embryos for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. **Plant Cell Rep**, 29:1-13.

LIMA, J.D.; MORAES, W.S. 2006. Controle de bactérias contaminantes em explantes de bananeira (*Musa* AAA cv. Caipira). **Pesquisa Agropecuária Tropical** 36:181-186.

MALDANER, j.; NICOLOSO, F.T.; SANTOS, E.S.; FLORES, R.; SKREBSKY, E.C. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, jul-ago, 2006.

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

NASS LL. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS LL, VALOIS ACC, MELO IS, VALADARES-INGLIS MC, Editores. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT; 2001.

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; MARTINS, C.F.; RUSSOWSKI, D. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.3, n.2, p. 11-8, 2001.

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C.F. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.27, n.1, p. 84-90, jan./fev., 2003.

NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, Y.; FUJINO, M.; INOUE, S-S.; TAKEMOTO, T.; OLIVEIRA, F. de; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G.; TANAKA, O.; KASAI, R.; MATSUURA, H. Ecdysteroids from *Pfaffia iresinoides* and reassignment of some <sup>13</sup>CNMR chemical shifts. **Phytochemistry**, v.26, p.2505-2507,1987.

NISHIMOTO, N. et al. Ecdisteroides de *Pfaffia glomerata*. In: SIMPOSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 11, 1990, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 1990. p.45.

NISHIMOTO R.K. Evaluation of pre-emergence herbicides for establishing coffee. **Tropical Pest Management** 38: 298-301. 1992.

OLIVEIRA, R.P.; NINO, A.F.P. Potencial de multiplicação *in vitro* de cultivares de framboeseira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.31, p.280-284, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v31n1/v31n1a40.pdf>>.

PEREIRA, G.A.; CORREA, L.S.; BOLIANI, A.C. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira ‘Grande naine’ em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Fruticultura** Edição Especial: 222-226. 2011.

PEREIRA, M.R.; CARVALHO, V.S.; LUCAS, E.F.; GRAVINA, A.G. Amido de milho e hipoclorito de sódio no enraizamento *in vitro* do abacaxizeiro vitória e seu efeito na aclimatização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 2, p. 528- 533, Junho 2015.

SAEG Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: **Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa**, 2007.

SARASAN, V. et al. Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decade. **In vitro cellular developmental biology-plant**, v.42, p.206-214, 2006.

SHIOBARA, Y. et al. Iresinoside, a yellow pigment from *Pfaffia iresinoides*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 32, no. 6, p. 1527-1530, 1992.

SOUZA, J.A.; SCHUCH, M.W.; SILVA, L.C.; SOARES, G.C. 2006. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret) e pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **Revista Científica Rural** 11: 39-44.

TERMIGNONI, R.R. **Cultura de Tecidos Vegetais: Morfogênese e crescimento in vitro**. 1ªed. Editora da UFRGS, Porto Alegre, 2005.

VIEIRA, R.D.; PENARIOL, A.L.; PERECIN, D.; PANOBIANCO, M. Condutividade elétrica e teor de água inicial das sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, p.1333-1338, 2002.

## **CAPÍTULO II - CRIOPRESERVAÇÃO DE ÁPICES CAULINARES DE *Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN PELO MÉTODO DE VITRIFICAÇÃO**

### **RESUMO**

A espécie *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae), conhecida popularmente como ginseng-brasileiro, é muito procurada por suas propriedades medicinais, obtidas principalmente de suas raízes. Dentre os compostos extraídos dessa espécie destacam-se os ácidos oleanólico e famérico, ecdisterona e rubrosterona. Dessa forma, torna-se de grande importância a conservação de seu germoplasma. A criopreservação surge como a técnica mais eficiente de conservação de recursos genéticos, pois reduz muito e até mesmo paralisa a atividade celular da planta, contribuindo para o armazenamento em longo prazo da espécie. O objetivo desse trabalho foi definir um protocolo de criopreservação pelo método de vitrificação para ápices caulinares de *Pfaffia glomerata*. Inicialmente foi realizado o isolamento dos AC da espécie em estudo. Para o teste de vitrificação, os ápices isolados foram acomodados em meio de pré-cultivo por 18h. Após esse período, realizou-se as etapas de saturação, exposição a PVS, congelamento, descongelamento, diluição e inoculação do material *in vitro*. Foram adotados três soluções (PVS<sub>2</sub>, PVS<sub>3</sub> e PVS<sub>4</sub>), três tempos de exposição a solução de vitrificação (20 min, 40 min e 60 min), e duas temperaturas para cada solução de vitrificação (25°C e 0°C). Observou-se que na solução de PVS<sub>2</sub> a maior sobrevivência das plântulas após o congelamento em nitrogênio líquido, é de 63%, na temperatura de 25°C, no tempo de 60 minutos. Na solução de PVS<sub>3</sub> o melhor resultado de regeneração foi 42%, na temperatura de 25°C no tempo de 60 minutos. Na solução de PVS<sub>4</sub> o melhor resultado foi de 65% de regeneração das plântulas, na temperatura de 25°C, no tempo de 60 minutos. Concluiu-se que a melhor metodologia de vitrificação para conservar o germoplasma de ginseg-brasileiro, através de ápices caulinares, é na solução de PVS<sub>4</sub> no tempo de 60 minutos, na temperatura de 25°C.

Palavras-chave: Ginseng-brasileiro; nitrogênio líquido; conservação de recursos genéticos.

## 2.1.INTRODUÇÃO

A criopreservação é definida como a conservação de material biológico em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , ou em sua fase de vapor, a  $-150^{\circ}\text{C}$  (SANTOS, 2001). É considerada o método ideal para a conservação em longo prazo de germoplasma vegetal, por permitir o armazenamento de amostras por tempo indefinido, mantendo sua estabilidade genética e suas características fenotípicas, usando pouco espaço e requerendo pouca manutenção (ENGELMANN, 1997; CARVALHO & VIDAL, 2003).

A criopreservação pode ser aplicada para a conservação de uma variedade de materiais vegetativos como, por exemplo, gemas apicais, gemas axilares, embriões zigóticos, embriões somáticos, calos e suspensões celulares (NOGUEIRA, 2013). O maior desafio durante o desenvolvimento de protocolos de criopreservação é realizar o congelamento sem que ocorra a formação de cristais de gelo no interior das células (NOGUEIRA, 2013). Esses cristais causam ruptura das membranas celulares resultando em perda da semi-permeabilidade e da compartimentação celular (CARVALHO, 2007; SANTOS, 2001).

A formação de cristais de gelo pode ser prevenida com a redução do conteúdo da água celular, e uma das técnicas disponíveis para desidratação é a vitrificação, que possibilita a passagem da água diretamente da fase líquida para uma fase sólida amorfa (ou de vidro), evitando assim a formação de gelo cristalino no interior da célula (PANIS; LAMBARDI, 2005).

Protocolos de criopreservação utilizando a vitrificação têm sido desenvolvidos para suspensões de células, calos, ápices caulinares, embriões somáticos e zigóticos de diferentes espécies de plantas (SHARMA, 2005). Esta técnica de conservação dos recursos genéticos vegetais tem apresentado bons resultados em virtude de reduzir muito ou praticamente paralisar qualquer atividade em nível celular minimizando a deterioração biológica durante o armazenamento (MARTINKOVÁ & HONEK, 2007; TRESENA *et al.*, 2009).

Espécies do gênero *Pfaffia*, o ginseng-brasileiro, são utilizadas na medicina popular, devido a suas propriedades medicinais (MARTINS & NICOLOSO, 2004). A espécie de ginseng-brasileiro de maior importância é a *Pfaffia glomerata* (ZIMMER *et al.*, 2006), cujo habitat principal são as matas ciliares da região Centro-Oeste do Brasil e bacia do rio Paraná. As raízes de *P. glomerata* são ricas em saponinas triterpênicas e

ecdisteróides (SHIOBARA *et al.*, 1993), cujo teor varia de acordo com a amostra (FIGUEIREDO *et al.*, 2004). O efeito adaptógeno desta espécie é atribuído ao fitoecdisteróide B-ecdisona, que inclusive é o composto utilizado como marcador químico da qualidade das raízes (ZIMMER *et al.*, 2006). Vários compostos foram isolados e identificados em *P. glomerata*, como o ácido oleanólico, ácido famérico, além de ecdisterona e rubrosterona (SHIOBARA *et al.*, 1993).

Considerando a importância de conservação do germoplasma da espécie *Pfaffia glomerata*, (Spreng.) Pedersen, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um protocolo de criopreservação pelo método de vitrificação para ápices caulinares de *Pfaffia glomerata*.

## **2.2.METODOLOGIA**

### **2.2.1 Introdução e multiplicação *in vitro* de *P. glomerata***

Para a realização dos experimentos de criopreservação, gemas laterais foram coletadas de plantas da espécie *P. glomerata* em crescimento no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e introduzidos *in vitro* em meio de cultura MS básico solidificado com ágar (0,7%) e cultivadas em sala de crescimento com temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de  $40\ \mu\text{m}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas. Após 30 dias de cultivo AC e gemas laterais das plântulas obtidas foram repicadas para o mesmo meio para a produção do lote de plântulas utilizadas como doadoras de explante para os experimentos de criopreservação. Todos esses procedimentos foram realizados em cabine de fluxo laminar, em condições assépticas.

### **2.2.2 Cultivo de seguimentos nodais**

Segmentos nodais foram isolados de plântulas em crescimento *in vitro* com cerca de 5 cm de comprimento e transferidos para caixa magenta, contendo 50 ml de meio de multiplicação MS suplementado com BAP (0,02 mg/L), ANA (0,01 mg/L), GA<sub>3</sub> (0,1 mg/L) e solidificado com ágar (0,7%) (Figura 2.1-A). As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de  $40\ \mu\text{m}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas. Após 15 dias de

cultivo AC com aproximadamente 1,0 mm de tamanho foram isolados para uso nos testes de criopreservação pela técnica de vitrificação.

### 2.2.3 Pré-cultivo e vitrificação dos ápices caulinares

Os AC isolados foram transferidos para placas de Petri contendo papel filtro esterilizado e umedecido com 3,0 ml de água destilada esterilizada. Após o isolamento dos AC os explantes foram transferidos para uma outra placa de Petri contendo 20 ml de meio MS sólido contendo 0,3 M de sacarose, por um período de 18 horas (pré-cultivo), Figura 2.1-B. O material foi mantido em sala de crescimento com temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de  $40\ \mu\text{m}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas.

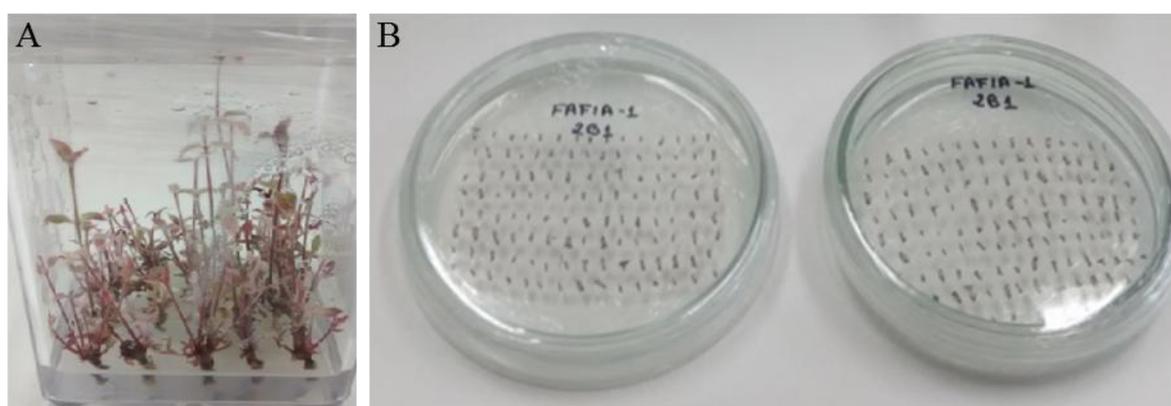


Figura 2.1. Plântulas de *Pfaffia glomerata* (A) e explantes em meio de pré-cultivo (B). Foto: Daniela Oliveira. 2015.

Foram realizados testes de vitrificação utilizando três soluções crioprotetoras: PVS<sub>2</sub> (MS-62 suplementado com 30% glicerol, 15% etilenoglicol, 15% DMSO, 0,4M sacarose), PVS<sub>3</sub> (MS-62 suplementado com 50% sacarose e 50% glicerol) e PVS<sub>4</sub> (MS-62 suplementado com 35% glicerol, 20% etilenoglicol e 0,6M sacarose) e duas temperaturas ( $25^{\circ}\text{C}$  e  $0^{\circ}\text{C}$ ) para cada solução de vitrificação. Foram testados três tempos distintos de exposição às soluções de vitrificação, 20, 40 e 60 minutos. O teste de vitrificação consiste das seguintes etapas: saturação (SST), exposição à PVS, congelamento, descongelamento, diluição e inoculação, Figura 2.2. Os detalhes destas diferentes etapas estão descritos a seguir.

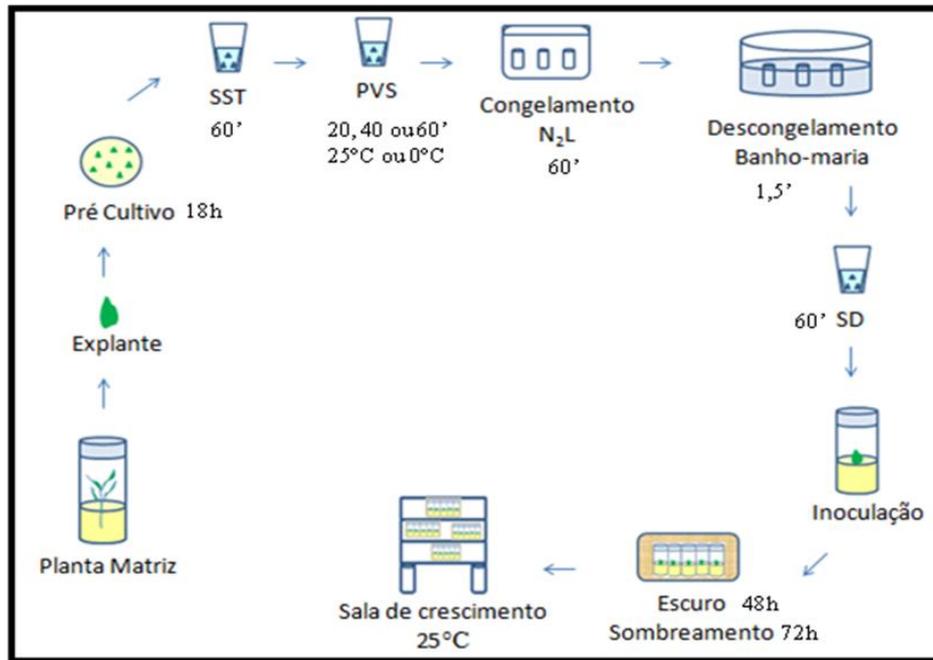


Figura 2.2. Método de vitrificação. Esquema: Daniela Oliveira. 2016.

#### a) Saturação

Após o período de pré-cultivo os AC foram transferidos para criotubos aos quais foram adicionados 2,0 ml de solução de saturação (MS + 2,0 M glicerol + 0,4 M sacarose) e deixando agir por 60 minutos a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  (temperatura ambiente). Após 30 minutos a solução foi removida com o auxílio de uma pipeta Pasteur graduada e foi adicionado mais 2,0 ml de solução fresca aos tubos, sendo mantido a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  (temperatura ambiente) por mais 30 minutos.

#### b) Exposição à PVS

A solução de saturação foi removida com pipeta Pasteur e foi adicionada 2,0 ml de solução de vitrificação PVS<sub>2</sub> ( $25^\circ\text{C}$  ou  $0^\circ\text{C}$ ) deixando agir por 20 minutos. Após 10 minutos foi removida a solução PVS<sub>2</sub> usando uma pipeta e adicionados mais 2,0 ml de solução PVS<sub>2</sub> fresca ( $25^\circ\text{C}$  ou  $0^\circ\text{C}$ ) aos tubos, mantidos a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  (temperatura ambiente) por mais 10 minutos. Nessa etapa foi utilizado o fator temperatura,  $25^\circ\text{C}$  ou  $0^\circ\text{C}$ . A

temperatura de 0°C é obtida através de frascos contendo a PVS imersos em isopor contendo gelo triturado e monitorado com o auxílio de termômetro.

### c) Congelamento

A solução de PVS<sub>2</sub> foi retirada dos criotubos usando uma pipeta e adicionado 2,0 ml de solução PVS<sub>2</sub> fresca. Os frascos foram fechados e mergulhados no nitrogênio líquido (velocidade de congelamento:  $\pm 300^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) por 60 minutos, Figura 2.3.



Figura 2.3. Método de vitrificação (A) e congelamento em NL (B). Foto: Daniela Oliveira. 2016.

### d) Descongelamento

O método de descongelamento foi rápido, e consistiu em remover os criotubos do N<sub>2</sub>L e submergi-los em banho-maria a  $40\pm 2^{\circ}\text{C}$  (velocidade de descongelamento:  $\pm 250^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .). Os tubos foram agitados constantemente por aproximadamente 1,5 min. Imediatamente após o descongelamento a solução PVS<sub>2</sub> foi removida com auxílio de uma pipeta.

e) *Diluição da PVS*

Foi adicionado 2,0 ml de solução de diluição (SD) (MS líquido + 1,2 M sacarose) deixando agir por 60 min, após 30 min a solução foi removida usando uma pipeta e foram adicionados mais 2,0 ml de solução fresca aos tubos, mantidos a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  (temperatura ambiente) por mais 30 minutos.

f) *Inoculação e cultivo in vitro*

Os AC foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio de regeneração MS básico, cultivados no escuro por 48 horas e em luz difusa por 3 dias, em sala de crescimento a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Após esse período o material foi cultivado nas condições padrão de luz normal da sala de crescimento, fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de  $40 \mu\text{m}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas. Esse procedimento foi realizado para PVS<sub>2</sub>, também nos tempos 40 e 60 minutos. E para PVS<sub>3</sub> e PVS<sub>4</sub>, nos tempos adotados (20, 40 e 60 minutos). Em cada experimento foi alterado apenas o tipo de solução de vitrificação testada e o tempo de exposição à solução de vitrificação e a temperatura da solução de vitrificação. Todo esse procedimento foi realizado em condições assépticas em cabine de fluxo laminar.

g) *Análise estatística dos dados*

O delineamento estatístico utilizado foi o fatorial, com quatro fatores, tipo de solução de vitrificação, tempo de exposição à solução de vitrificação, temperatura de tratamento e congelamento em nitrogênio líquido, sendo três soluções de vitrificação (PVS<sub>2</sub>, PVS<sub>3</sub> e PVS<sub>4</sub>), três tempos de exposição a solução de vitrificação (20 min, 40 min e 60 min), duas temperaturas referente a solução de vitrificação ( $25^{\circ}\text{C}$  e  $0^{\circ}\text{C}$ ) e nitrogênio (-N<sub>2</sub>L e +N<sub>2</sub>L). Estes 36 tratamentos (combinações entre os fatores) foram replicados seis vezes e as 216 unidades experimentais foram dispostas no delineamento inteiramente ao acaso. Para a análise estatística, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade ( $p\leq 0,01$ ). As análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.00 e GENES, Cruz, 2013. Após cada etapa do método de vitrificação foi retirado um controle no total de sessenta explantes para cada controle, ao se isolar os explantes para experimento (Controle de Explante - CE), após a etapa de pré cultivo (Controle de pré

cultivo - CPC), após a etapa de saturação (Controle de saturação - CS), após a PVS (Controle de vitrificação, -N<sub>2</sub>L). Cada experimento foi realizado durante 5 dias e monitorado por 30 dias os controles e por 60 dias o material congelado em N<sub>2</sub>L.

## 2.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo estão apresentados abaixo. A análise de variância referente a regeneração dos explantes de *P. glomerata* após o teste de vitrificação, considerando todos os fatores, congelamento em nitrogênio líquido (-N<sub>2</sub>L, +N<sub>2</sub>L), temperatura da PVS (25°C, 0°C), tempo de exposição a solução de vitrificação (20min, 40min, 60min) e suas interações. Conforme observado na Tabela 2.1, as interações triplas foram não significativas. Quanto as interações de segunda ordem, apenas aquelas envolvendo o fator nitrogênio foram significativas (p≤0,01). Em decorrência disso foi necessário isolar o fator nitrogênio e analisar os demais fatores. Cada um deles pôde ser estudado isoladamente nos níveis de nitrogênio. Com coeficiente de variação de 4,50, sendo considerado um bom controle experimental.

Tabela 2.1. Análise de Variância da regeneração de *Pfaffia glomerata* considerando os fatores nitrogênio, temperatura, tempo e solução, bem como suas interações.

Fontes de variação	Gl	F	Significância
Nitrogênio	1	5073,36	
Temperatura	1	34,22	
Tempo	2	63,21	
Solução	2	52,99	
Nitrogênio*temperatura	1	35,57	
Nitrogênio*tempo	2	64,72	
Nitrogênio*solução	2	38,57	
Temperatura*tempo	2	13,15	
Temperatura*solução	2	1,08	
Tempo*solução	4	2,76	
Nitrogênio*temperatura*tempo	2	6,36	0,0573 <sup>ns</sup>
Nitrogênio*Temperatura*solução	2	0,14	ns
Nitrogênio*Tempo*Solução	4	3,62	0,1202 <sup>ns</sup>
Resíduo	4		
Média geral	=	64,55	
Coeficiente de variação	=	4,50	

Significativo ao nível de 1%.

A análise de variância para o fator solução no nitrogênio 1 não é significativa, com coeficiente de variação de 2,225 (Tabela 2.2); As médias dos tratamentos são apresentados na Tabela 2.3.

Tabela 2.2. Análise de Variância considerando o fator solução no Nitrogênio 1 (-N<sub>2</sub>L).

Fontes de variação	G.l.	F	Significância
Solução	2	1,04	0,37 <sup>ns</sup>
Resíduo	15		
Coeficiente de variação	= 2,22		

Tabela 2.3. Médias para o estudo do efeito de solução no nitrogênio 1 (-N<sub>2</sub>L).

Solução	Dados	Médias
PVS <sub>4</sub>	6	100,00
PVS <sub>2</sub>	6	99,00
PVS <sub>3</sub>	6	98,16

Conforme análises de variância considerando o fator solução dentro de nitrogênio 2 (+N<sub>2</sub>L) não há diferença significativa entre as soluções (Tabela 2.4). Apresenta coeficiente de variação 50,06. Com médias 40,16 para PVS<sub>4</sub>, 32,16 para PVS<sub>2</sub> e 17,83 para a PVS<sub>3</sub> (Tabela 2.5).

Tabela 2.4. Análise de Variância considerando o fator solução no Nitrogênio 2 (+N<sub>2</sub>L).

Fontes de variação	G.l.	F	Significância
Solução	2	3,39	0,06 <sup>ns</sup>
Resíduo	15		
Coeficiente de variação	= 50,06		

Tabela 2.5. Médias para o estudo do efeito de solução no nitrogênio 2 (+N<sub>2</sub>L).

Solução	Dados	Médias
PVS <sub>4</sub>	6	40,16
PVS <sub>2</sub>	6	32,16
PVS <sub>3</sub>	6	17,83

A análise de variância, com decomposição em polinômios ortogonais, realizada para regeneração em função do tempo é apresentada na Tabela 2.6. O coeficiente de variação de 2,34 confirmando um alto controle experimental. Nenhum componente de

regressão linear ou quadrática apresentou significância, assim sugere-se que o efeito de tempo é aproximadamente constante.

Tabela 2.6. Análise de Variância da regeneração de *Pfaffia glomerata* em função do tempo.

Fontes de variação	G.l.	F	Significância
Tempo	2	0,19	ns
Linear $r^2=0,36$	1	0,13	ns
Quadrática $r^2=1,00$	1	0,25	ns
Resíduo	15		
Coefficiente de variação	= 2,34		

Tabela 2.7. Análise de Variância da regeneração de *Pfaffia glomerata* em função do tempo, decomposta em polinômios ortogonais, no nitrogênio 2 (N<sub>2</sub>L+).

Fontes de variação	G.l.	F	Significância
Tempo	2	5,83	0,01
Linear $r^2=0,81$	1	9,47	0,007*
Quadrática $r^2=1,00$	1	2,19	0,15
Resíduo	15		
Coefficiente de variação	= 45,24		

\* Significativo ao nível de 1%.

Dessa forma o modelo encontrado de regressão linear encontra-se abaixo:

$$\text{Reg} = 5,8888 + 12,0833 \times \text{Tempo}, r^2 = 0,81$$

Assim, quanto maior o tempo de exposição à PVS maior a regeneração dos explantes de *P. glomerata*.

A análise de variância da regeneração em função do fator temperatura no nitrogênio 1 (-N<sub>2</sub>L) é não significativa (Tabela 2.8). Com médias de 99,11 e 99,00 nas temperaturas 0°C e 25°C, respectivamente (Tabela 2.9).

Tabela 2.8. Análise de Variância da regeneração em função da temperatura no Nitrogênio 1 (-N<sub>2</sub>L).

Fontes de variação	G.l.	F
Temperatura	1	ns
Resíduo	16	
Coefficiente de variação	= 2,29	

Tabela 2.9. Médias para o estudo do efeito de temperatura no nitrogênio 1 (-N<sub>2</sub>L).

Temperatura	Dados	Médias
0°C	9	99,11
25°C	9	99,00

A análise de variância da regeneração em função da temperatura no nitrogênio 2 (+N<sub>2</sub>L) é não significativa (Tabela 2.10). Com médias 35,78 e 24,33 nas temperaturas 25°C e 0°C respectivamente (Tabela 2.11).

Tabela 2.10. Análise de Variância da regeneração em função da temperatura no Nitrogênio 2 (+N<sub>2</sub>L).

Fontes de variação	G.l.	F	Significância
Temperatura	1	2,171	ns
Resíduo	16		
Coefficiente de variação	= 54,82		

Tabela 2.11. Médias para o estudo do efeito de temperatura no nitrogênio 2 (+N<sub>2</sub>L).

Temperatura	Dados	Médias
25°C	9	35,77
0°C	9	24,33

Observou-se nas análises das interações entre os fatores solução, temperatura e tempo em relação ao nitrogênio apesar de serem significativas essas significâncias não são importantes, pois em todos os níveis de nitrogênio sempre os níveis dos fatores maiores são os mesmos. Assim, estudou-se o nitrogênio separadamente, valendo para os demais fatores.

Segundo análise de variância da regeneração em função de nitrogênio, há efeito significativo (Tabela 2.12). Com médias 99,05 e 30,05 para nitrogênio 1 (-N<sub>2</sub>L) e 2 (+N<sub>2</sub>L) respectivamente (Tabela 2.13).

Tabela 2.12. Análise de Variância da regeneração em função do Nitrogênio.

Fontes de variação	G.l.	F	Significância
Nitrogênio	1	290,45	0,00
Resíduo	34		
Coefficiente de variação	= 18.81		

Tabela 2.13. Médias para o estudo do efeito de regeneração em função do nitrogênio.

Nit	Dados	Médias
1	18	99,05
2	18	30,05

As porcentagens de regeneração de AC de *P. glomerata* submetidas ao teste de vitrificação com a solução PVS<sub>2</sub> a 25°C e 0°C, por 20, 40 e 60 minutos encontram-se na Tabela 2.14. Quando os ápices caulinares foram tratados com a solução PVS<sub>2</sub> a temperatura de 25°C, observou-se regeneração de 99-100% para explantes que não foram congelados (-N<sub>2</sub>L) e de 32%, 19% e 63% para ápices caulinares submetidos à vitrificação por 20, 40 e 60 minutos, respectivamente, e em seguida congelados em nitrogênio líquido (+N<sub>2</sub>L) (Figura 2.4 A, C, E).

A regeneração dos explantes de ginseng brasileiro submetidos ao teste de vitrificação com a solução de PVS<sub>2</sub> a 0°C por 20, 40 e 60 minutos constam na Figura 2.4 B, D e F, com 100, 100 e 95%, respectivamente, de regeneração para os explantes não congelados (-N<sub>2</sub>L) e 24, 20 e 34%, respectivamente, para ápices caulinares congelados em nitrogênio líquido (+N<sub>2</sub>L).

O aspecto das plântulas obtidas de ápices caulinares tratados com a solução de vitrificação PVS<sub>2</sub> em duas temperaturas diferentes (25°C e 0°C) por três períodos de tempo distintos (20, 40 e 60 minutos), mas que não foram expostos ao nitrogênio líquido pode ser visto na figura 2.5. As figuras 2.6 e 2.7 mostram o aspecto das plântulas obtidas de ápices caulinares de *P. glomerata* submetidos à vitrificação com PVS<sub>2</sub> e à criopreservação em nitrogênio líquido. Na figura 2.6 encontram-se as plântulas originadas de ápices caulinares tratados com PVS<sub>2</sub> a 25°C por 20 (A), 40 (B) e 60 (C) e na figura 2.7 as plântulas regeneradas a partir dos ápices caulinares tratados com PVS<sub>2</sub>, a 0°C por 20 (A), 40 (B) e 60 (C) minutos.

Tabela 2.14. Resultado do Teste de vitrificação da espécie *Pfaffia glomerata*, na solução PVS<sub>2</sub>, nas temperaturas de 25°C e 0°C, e tempo de exposição de 20 e 40 minutos.

Tempo de exposição (min.)	25°C		0°C	
	-N <sub>2</sub> L(%)	+N <sub>2</sub> L(%)	-N <sub>2</sub> L(%)	+N <sub>2</sub> L(%)
20	100	32	100	24
40	100	19	100	20
60	99	63	95	34

-N<sub>2</sub>L Controle, sem congelamento; +N<sub>2</sub>L congelado em nitrogênio líquido.

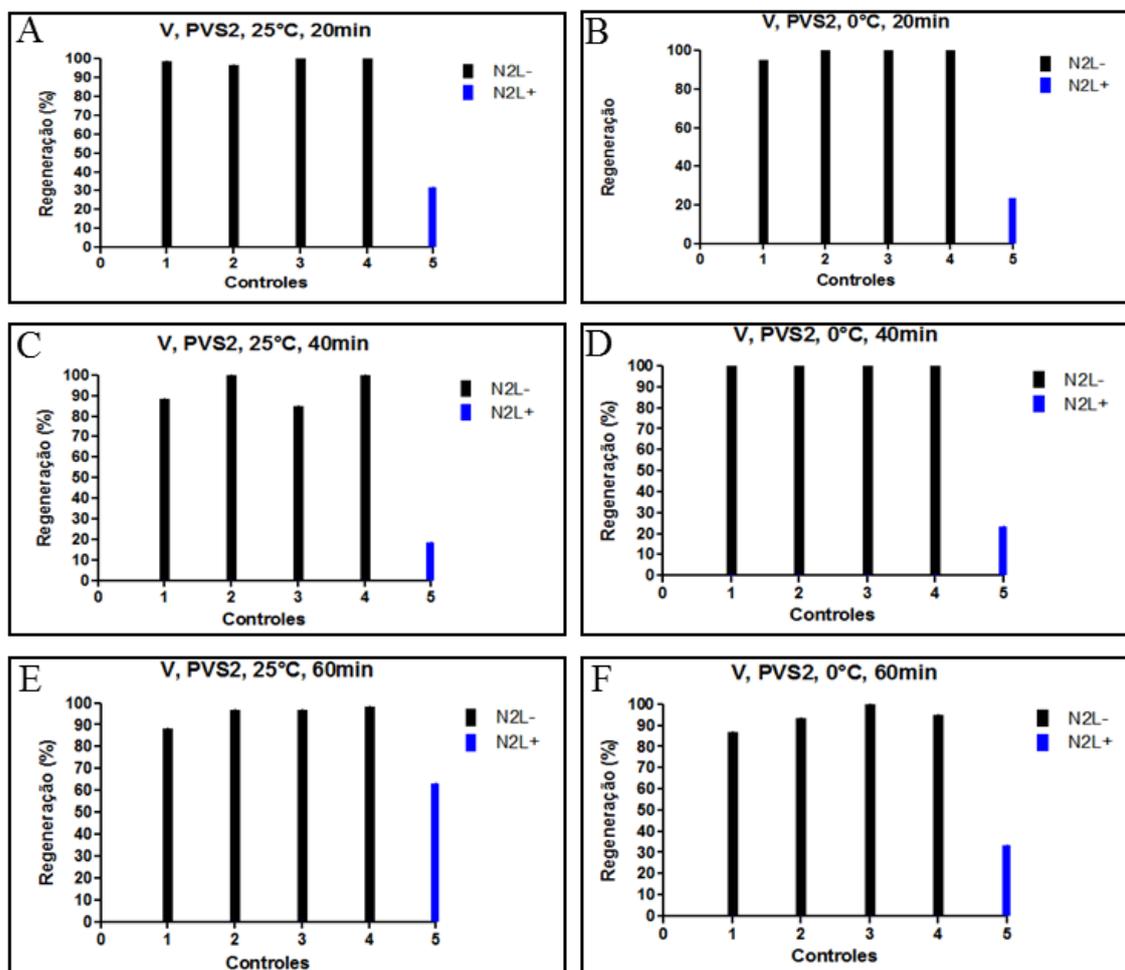


Figura 2.4. Porcentagem de regeneração de ápices caulinares de *P. glomerata* após a vitrificação com PVS<sub>2</sub>, em duas temperaturas distintas (0°C e 25°C), por 20, 40 e 60 minutos. As barras de cor preta, numeradas de 1-4, representam os controles (N<sub>2</sub>L<sup>-</sup>), em que 1- CE; 2- CPC; 3- CS; 4- CV (N<sub>2</sub>L<sup>-</sup>). A barra de cor azul, representa os ápices caulinares criopreservados (N<sub>2</sub>L<sup>+</sup>).

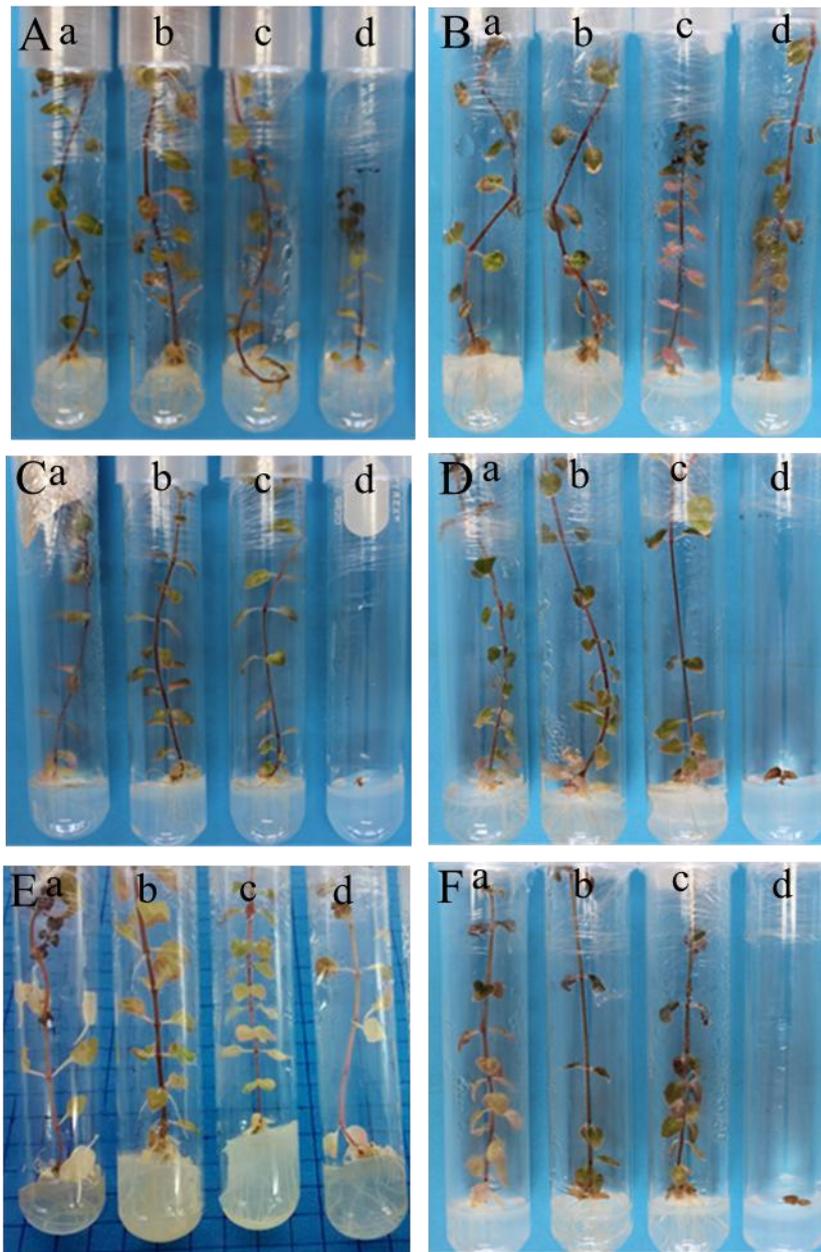


Figura 2.5. Aspecto das plântulas obtidas a partir de AC de *P. glomerata* que foram submetidos ao tratamento de vitrificação com a solução PVS<sub>2</sub> em duas temperaturas distintas (0°C e 25°C), por 20, 40 e 60 minutos, e seus respectivos controles. A-PVS<sub>2</sub>, 25°C, 20 min.; B-PVS<sub>2</sub>, 0°C, 20 min.; C-PVS<sub>2</sub>, 25°C, 40 min.; D-PVS<sub>2</sub>, 0°C, 40 min.; E-PVS<sub>2</sub>, 25°C, 60 min.; F-PVS<sub>2</sub>, 0°C, 60 min. Em todas as imagens: a-CE, b-CPC, c-CS, d-CV (N<sub>2</sub>L-). Fotos: Daniela Oliveira. 2016.

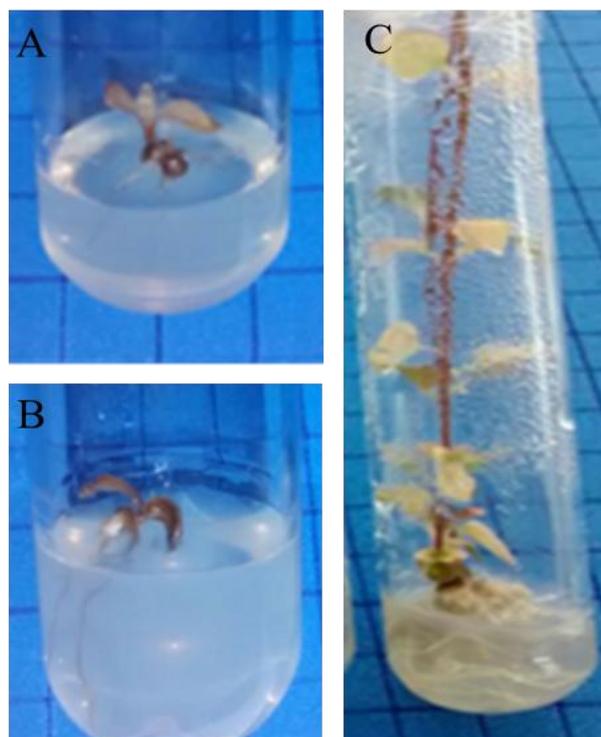


Figura 2.6. Aspecto das plântulas obtidas de AC de *P. glomerata* submetidos à vitrificação com PVS<sub>2</sub>, a 25°C por 20 (A), 40 (B) e 60 (C) minutos criopreservados em nitrogênio líquido. Fotos: Daniela Oliveira. 2016.

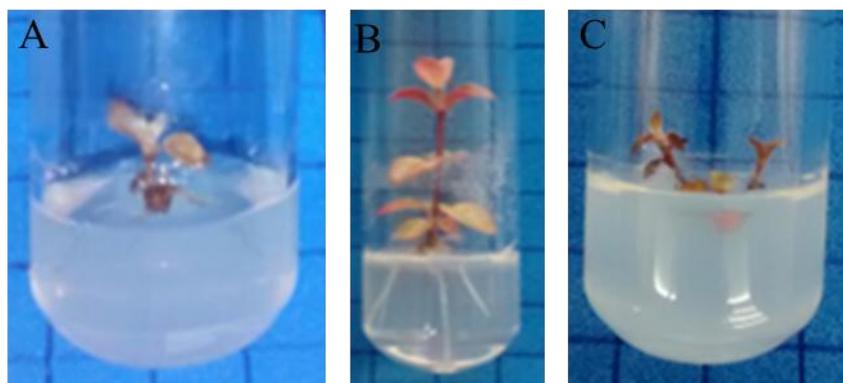


Figura 2.7. Aspecto das plântulas obtidas de AC de *P. glomerata* submetidos à vitrificação com PVS<sub>2</sub>, a 0°C por 20 (A), 40 (B) e 60 (C) minutos criopreservados em nitrogênio líquido. Fotos: Daniela Oliveira. 2016.

Os percentuais de regeneração dos explantes de *P. glomerata* submetidas ao teste de vitrificação na solução de PVS<sub>3</sub> em duas temperaturas distintas (0°C e 25°C), por 20, 40 e 60 minutos constam na Tabela 2.15 e Figura 2.8. Para os explantes não congelados (-N<sub>2</sub>L, barras de cor preta), observou-se 100, 92 e 100% de regeneração para AC tratados com PVS<sub>3</sub> a 25°C por 20, 40, e 60 minutos, respectivamente. Para os AC submetidos a estes mesmos tratamentos e em seguida congelados em nitrogênio líquido (+N<sub>2</sub>L, barras de

cor azul), observou-se 15, 10 e 42% de regeneração, respectivamente (Figura 2.8 A, C e E). A regeneração dos explantes submetidas à solução de PVS<sub>3</sub> a 0°C por 20, 40 e 60 minutos constam na Figura 2.8 B, D e F. Foram observados 97, 100 e 100% de regeneração para os explantes não congelados (-N<sub>2</sub>L, barras de cor preta) e 0, 15 e 25% para os congelados (+N<sub>2</sub>L, barras de cor azul).

O aspecto das plântulas obtidas a partir de AC de *P. glomerata* que foram submetidos ao tratamento de vitrificação com a solução PVS<sub>3</sub> em duas temperaturas distintas (0°C e 25°C), por 20, 40 e 60 minutos, mas não à criopreservação em nitrogênio líquido (controles) pode ser visto na figura 2.9. Plântulas obtidas de AC tratados com PVS<sub>3</sub> a 25°C estão na figura 2.9 A, C e E, e as imagens na figura 2.9 B, D e F mostram as plântulas obtidas de AC tratados com a solução de vitrificação PVS<sub>3</sub> à temperatura de 0°C.

A figura 2.10 mostra as plântulas obtidas de AC de *P. glomerata* submetidos à vitrificação com PVS<sub>3</sub> a 25°C por 20 (A), 40 (B) e 60 (C) minutos e à criopreservação em nitrogênio líquido. Na figura 2.11 observa-se o aspecto das plântulas obtidas de AC submetidos à vitrificação com PVS<sub>3</sub> a 0°C por 40 (A) e 60 (B) minutos e à criopreservação em nitrogênio líquido.

Nos experimentos realizados para ápices de *P. glomerata*, na solução de PVS<sub>3</sub>, a maior taxa de regeneração aconteceu no tempo de 60 minutos na temperatura de 25°C, com 42% de regeneração. A imersão dos AC nos demais tempos (20 e 40 minutos) em solução de vitrificação provavelmente não foi suficiente para promover a desidratação ideal e dessa forma, células com alto conteúdo de água livre, quando expostas ao NL, podem sofrer danos irreversíveis nas membranas devido aos efeitos da cristalização (MAZUR, 1984; SURANTHRAN et al., 2012).

Tabela 2.15. Resultado do Teste de vitrificação da espécie *P. glomerata*, na solução PVS<sub>3</sub>, 25°C e 0°C.

Tempo de exposição (min.)	25°C		0°C	
	-N <sub>2</sub> L(%)	+N <sub>2</sub> L(%)	-N <sub>2</sub> L(%)	+N <sub>2</sub> L(%)
20	100	15	97	0
40	92	10	100	15
60	100	42	100	25

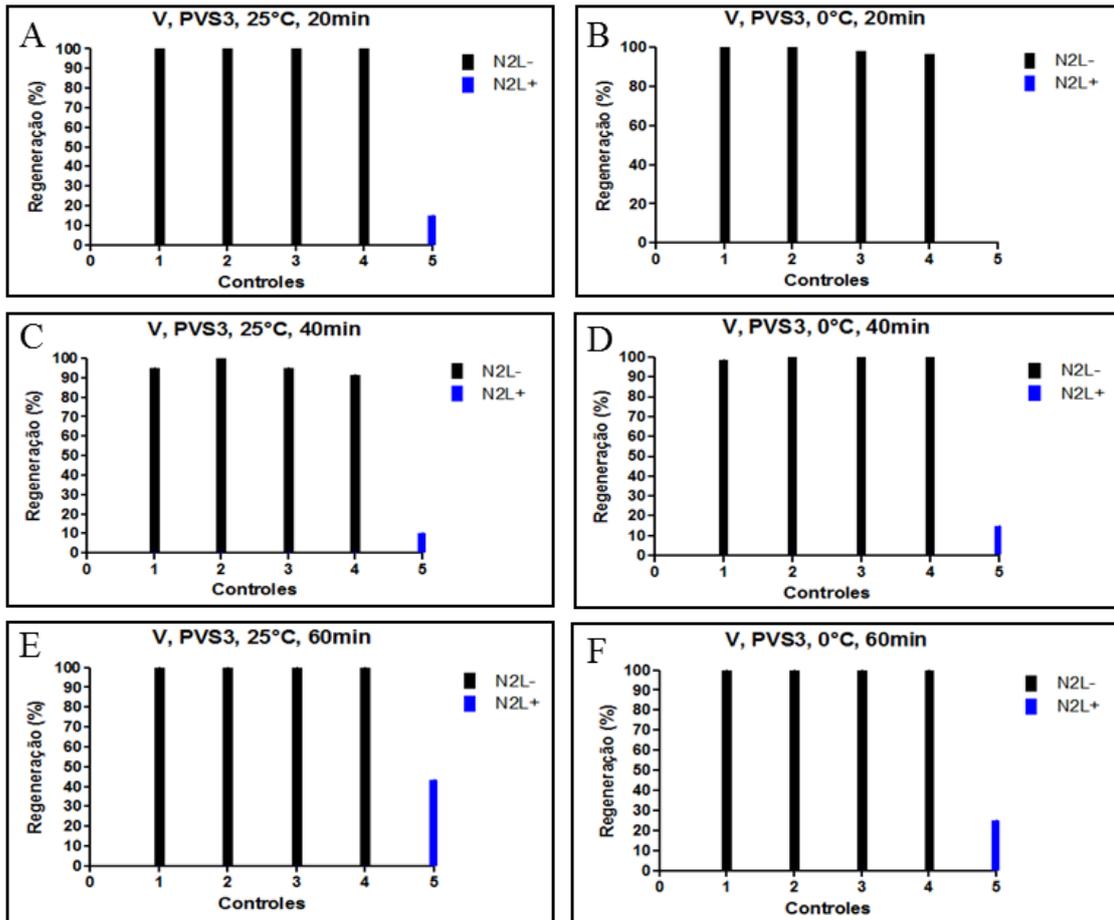


Figura 2.8. Percentuais de regeneração de AC de *P. glomerata* após a vitrificação com PVS<sub>3</sub>, em duas temperaturas distintas (0°C e 25°C), por 20, 40 e 60 minutos. As barras de cor preta, numeradas de 1-4, representam os controles (sem congelamento, N<sub>2</sub>L<sup>-</sup>), em que 1- CE; 2- CPC; 3- CS; 4- CV (N<sub>2</sub>L<sup>-</sup>). A barra de cor azul, representa as porcentagens de regeneração de AC após a criopreservação em nitrogênio (N<sub>2</sub>L<sup>+</sup>).

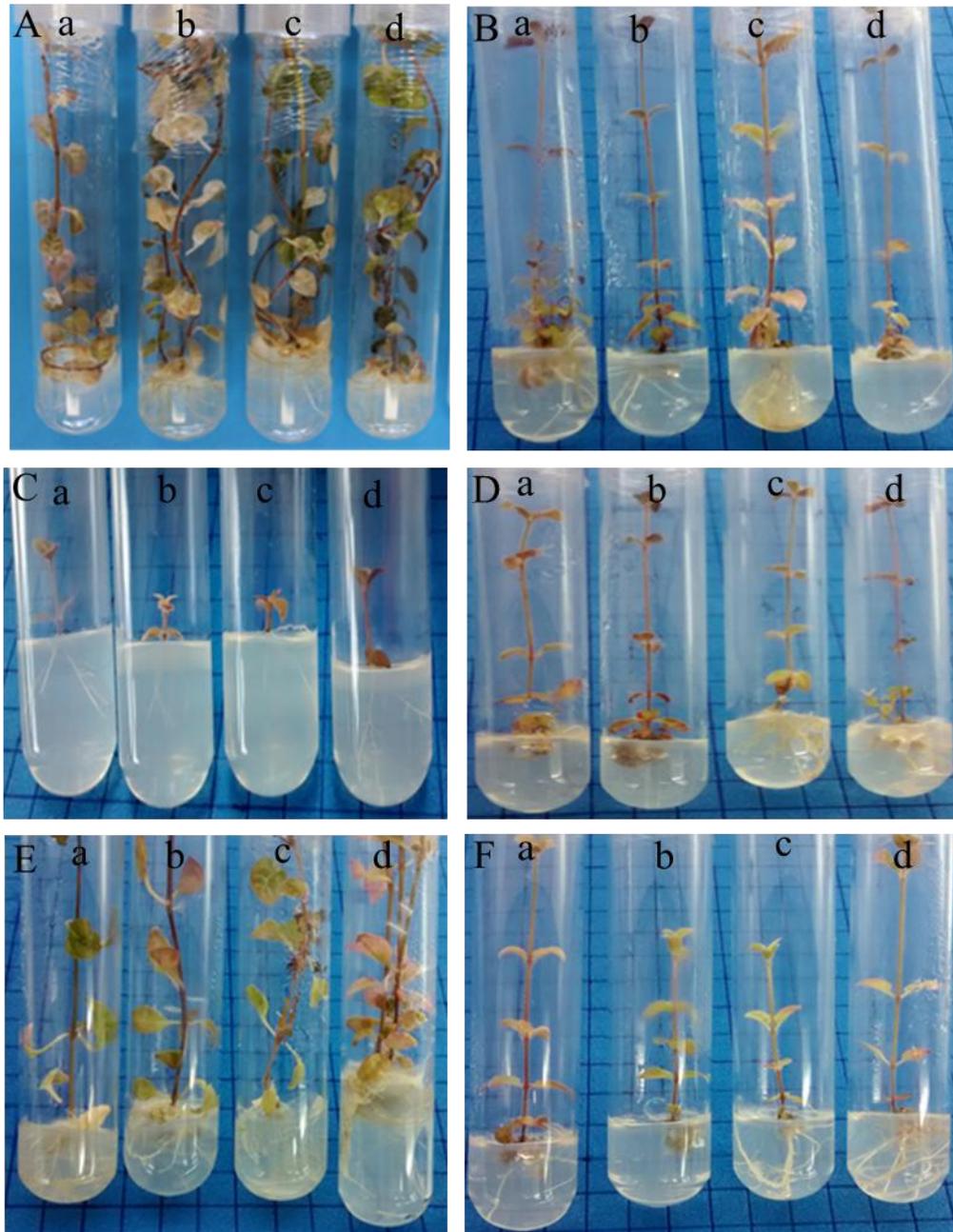


Figura 2.9. Aspecto das plântulas obtidas a partir de AC de *P. glomerata* que foram submetidos ao tratamento de vitrificação com a solução PVS<sub>3</sub> em duas temperaturas distintas (0°C e 25°C), por 20, 40 e 60 minutos, e seus respectivos controles. A-PVS<sub>3</sub>, 25°C, 20 min.; B-PVS<sub>3</sub>, 0°C, 20 min.; C-PVS<sub>3</sub>, 25°C, 40 min.; D-PVS<sub>3</sub>, 0°C, 40 min.; E-PVS<sub>3</sub>, 25°C, 60 min.; F-PVS<sub>3</sub>, 0°C, 60 min. Em todas as imagens: a-CE, b-CPC, c-CS, d-CV (N<sub>2</sub>L-). Fotos: Daniela Vasconcelos. 2016.

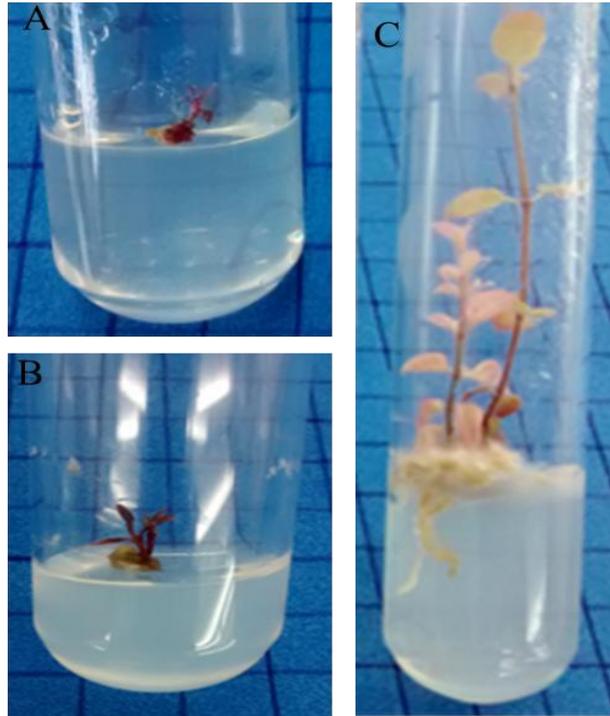


Figura 2.10. Aspecto das plântulas obtidas de AC de *P. glomerata* submetidos à vitrificação com PVS<sub>3</sub>, a 25°C por 20 (A), 40 (B) e 60 (C) minutos criopreservados em nitrogênio líquido. Fotos: D.V.O. 2016.

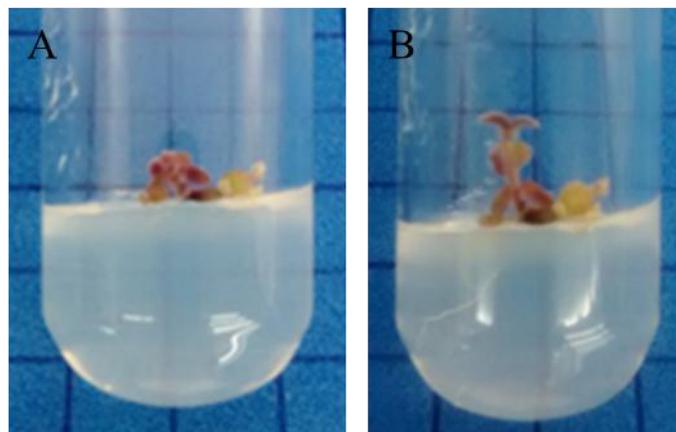


Figura 2.11. Aspecto das plântulas obtidas de AC de *P. glomerata* submetidos à vitrificação com PVS<sub>3</sub>, a 0°C por 40 (A) e 60 (B) minutos criopreservados em nitrogênio líquido. Fotos: Daniela Vasconcelos. 2016.

Os percentuais de regeneração de AC de *P. glomerata* após a vitrificação com PVS<sub>4</sub>, em duas temperaturas distintas (0°C e 25°C), por 20, 40 e 60 minutos encontram-se na Tabela 2.16. Na Figura 2.12 as barras de cor preta, numeradas de 1-4, representam os controles (sem congelamento, N<sub>2</sub>L-) e as barras de cor azul, representam as porcentagens de regeneração de AC após a criopreservação em nitrogênio (N<sub>2</sub>L+). Os explantes não

congelados (-N<sub>2</sub>L, barras de cor preta), tiveram regeneração de 100% após o tratamento com PVS<sub>4</sub> a 25°C por 20, 40, e 60 minutos (Figura 2.12 A, C e E). Para os AC submetidos a estes mesmos tratamentos e em seguida congelados em nitrogênio líquido (+N<sub>2</sub>L, barras de cor azul), observou-se 53, 44 e 65% de regeneração, respectivamente (Figura 2.12 A, C e E). A regeneração dos explantes submetidas à solução de PVS<sub>4</sub> a 0°C por 20, 40 e 60 minutos constam na Figura 2.12 B, D e F. Observou-se 100% de regeneração para os explantes não congelados (-N<sub>2</sub>L, barras de cor preta) e 25, 32 e 44% para os congelados (+N<sub>2</sub>L, barras de cor azul).

O aspecto das plântulas obtidas a partir de AC de *P. glomerata* que foram submetidos ao tratamento de vitrificação com a solução PVS<sub>4</sub> em duas temperaturas distintas (0°C e 25°C), por 20, 40 e 60 minutos, mas não à criopreservação em nitrogênio líquido (controles) pode ser visto na figura 2.13. Plântulas obtidas de AC tratados com PVS<sub>4</sub> a 25°C estão na figura 2.13 A, C e E, e as imagens na figura 2.13 B, D e F mostram as plântulas obtidas de ápices caulinares tratados com a solução de vitrificação PVS<sub>4</sub> à temperatura de 0°C.

A figura 2.14 mostra as plântulas obtidas de AC de *P. glomerata* submetidos à vitrificação com PVS<sub>4</sub> a 25°C por 20 (A), 40 (B) e 60 (C) minutos e à criopreservação em nitrogênio líquido. Na figura 2.15 observa-se o aspecto das plântulas obtidas de AC submetidos à vitrificação com PVS<sub>4</sub> a 0°C por 40 (A) e 60 (B) minutos e à criopreservação em nitrogênio líquido.

Tabela 2.16. Resultado do Teste de vitrificação da espécie *P. glomerata*, na solução PVS<sub>4</sub>, 25°C e 0°C, nos tempos de exposição de 20, 40 e 60 minutos.

Tempo de exposição (min.)	25°C		0°C	
	-N <sub>2</sub> L(%)	+N <sub>2</sub> L(%)	-N <sub>2</sub> L(%)	+N <sub>2</sub> L(%)
20	100	53	100	25
40	100	44	100	32
60	100	65	100	44

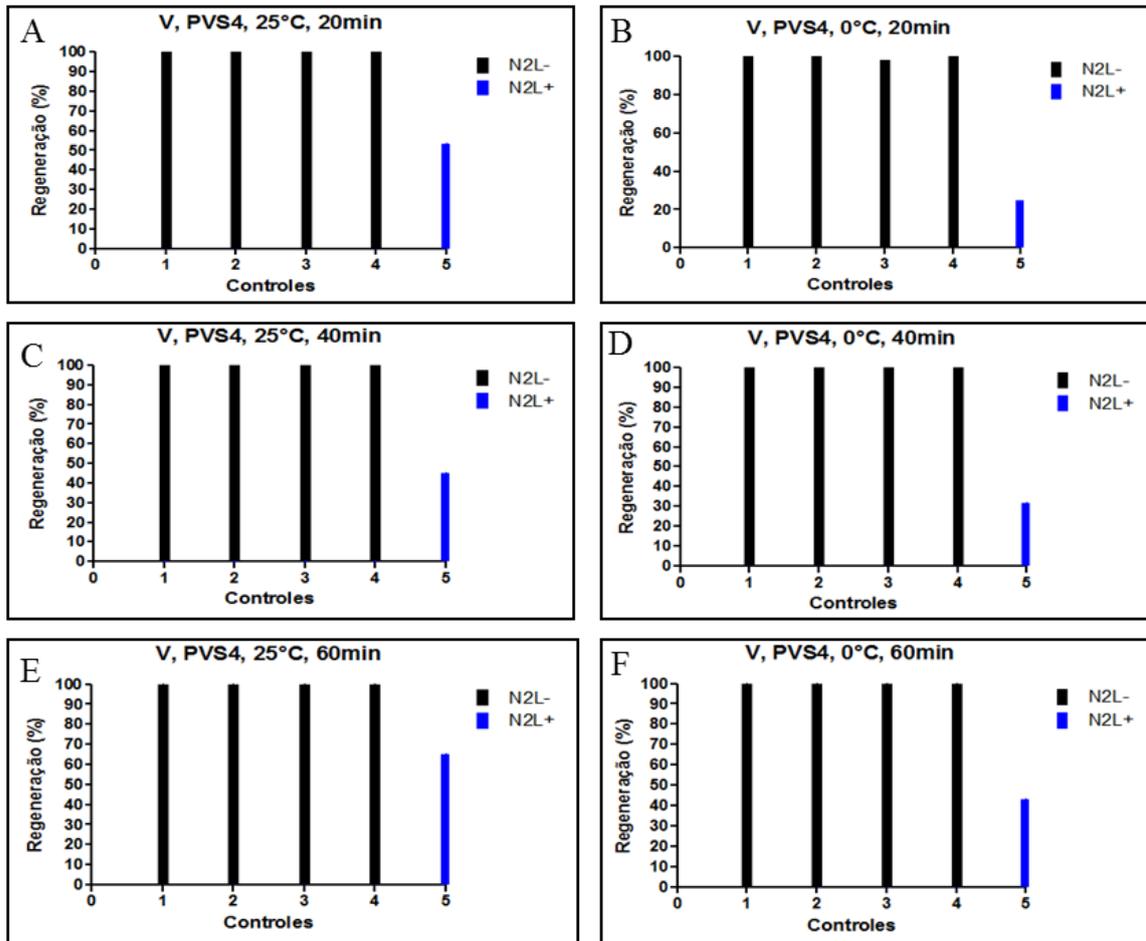


Figura 2.12. - Percentuais de regeneração de AC de *P. glomerata* após a vitrificação com PVS<sub>4</sub>, em duas temperaturas distintas (0°C e 25°C), por 20, 40 e 60 minutos. As barras de cor preta, numeradas de 1-4, representam os controles (sem congelamento, N<sub>2</sub>L-), em que 1- CE; 2- CPC; 3- CS; 4- CV (N<sub>2</sub>L-). A barra de cor azul, representa as porcentagens de regeneração de AC após a criopreservação em nitrogênio (N<sub>2</sub>L+).

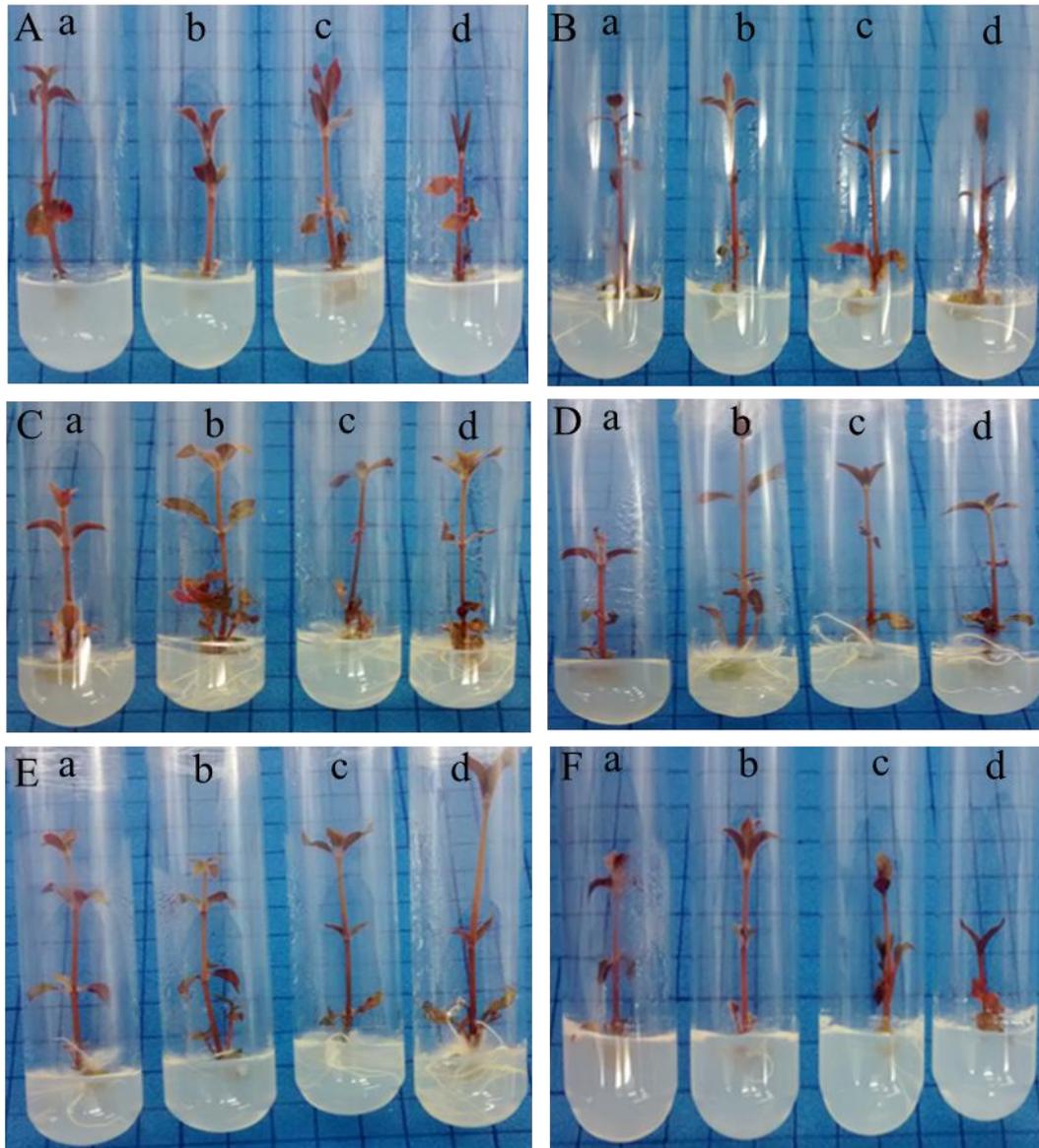


Figura 2.13 - Aspecto das plântulas obtidas a partir de AC de *P. glomerata* que foram submetidos ao tratamento de vitrificação com a solução PVS<sub>4</sub> em duas temperaturas distintas (0°C e 25°C), por 20, 40 e 60 minutos, e seus respectivos controles. A-PVS<sub>4</sub>, 25°C, 20 min.; B-PVS<sub>4</sub>, 0°C, 20 min.; C-PVS<sub>4</sub>, 25°C, 40 min.; D-PVS<sub>4</sub>, 0°C, 40 min.; E-PVS<sub>4</sub>, 25°C, 60 min.; F-PVS<sub>4</sub>, 0°C, 60 min. Em todas as imagens: a-CE, b-CPC, c-CS, d-CV (N<sub>2</sub>L-). Fotos: Daniela Oliveira. 2016.

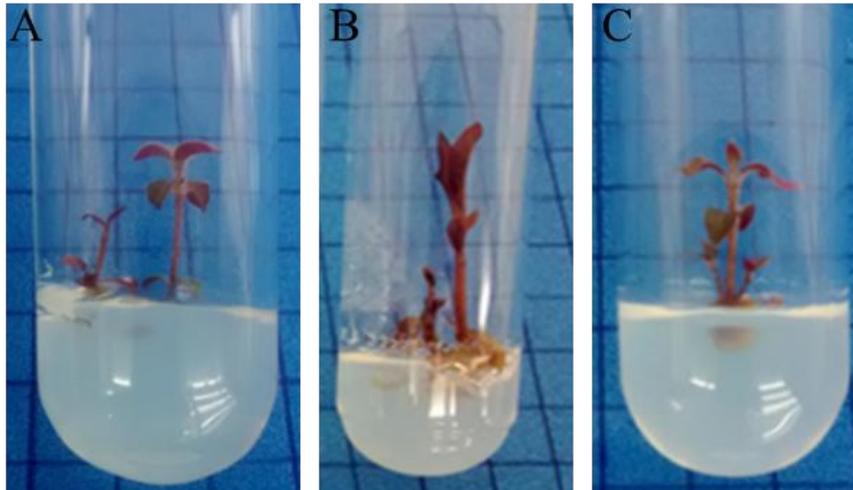


Figura 2.14. Plântulas de *P. glomerata* em PVS<sub>4</sub>, 25°C, NL+, A- 20 min.; B- 40 min.; C- 60 min. Fotos: Daniela Oliveira. 2016.

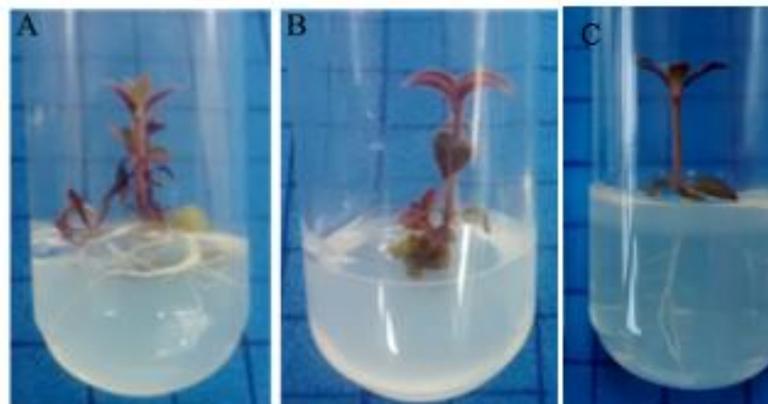


Figura 2.15 - Plântulas de *P. glomerata* em PVS<sub>4</sub>, NL+, 0°C, A- 20 min.; B- 40 min e C- 60 min. Fotos: Daniela Oliveira. 2016.

Os resultados de regeneração dos AC de *P. glomerata* são confirmados pela análise estatística realizada, em que quanto maior o tempo de exposição à solução de vitrificação maior será a regeneração dos AC. O uso da solução de vitrificação tem como objetivo impedir a formação de cristais de gelo no interior das células impedindo assim rupturas das membrana celulares. Embora os crioprotetores sejam necessários aos protocolos de criopreservação, pois diminuem as injúrias sofridas pelas células eles apresentam efeitos tóxicos. Dessa forma o nível de toxicidade das soluções crioprotetoras depende principalmente da concentração do crioprotetor utilizado bem como o tempo de exposição

das células a essas soluções. Nesse trabalho utilizou-se três soluções crioprotetoras distintas. Em todas as soluções (PVS<sub>2</sub>, PVS<sub>3</sub> e PVS<sub>4</sub>) a maior porcentagem de regeneração aconteceu no maior tempo de exposição à solução crioprotetora, confirmado tanto nos controles (-N<sub>2</sub>L) quanto nos explantes congelados em NL. Não houve diferença significativa entre as soluções, mas podemos afirmar que a maior porcentagem de regeneração dos AC de *P. glomerata*, na temperatura de 25°C e na temperatura de 0°C foi na solução de PVS<sub>4</sub> seguida da solução de PVS<sub>2</sub> e por último solução de PVS<sub>3</sub>. Entre as temperaturas adotadas a maior porcentagem de regeneração ocorreu nas soluções de vitrificação na temperatura de 25°C. Entre as soluções adotadas a solução de PVS<sub>3</sub> foi a com menor taxa de regeneração dos AC de *P. glomerata*, essa solução é composta apenas de sacarose e glicerol, diferente da solução de PVS<sub>2</sub> que contém além desses dois componentes contém o etilenoglicol e o DMSO e a solução de PVS<sub>4</sub> que contém além de sacarose e glicerol, contém o etilenoglicol. A ausência do DMSO na solução de PVS<sub>4</sub> pode ser considerado um dos fatores para uma maior porcentagem de regeneração dos AC de *P. glomerata* após o congelamento em NL, esse componente apresenta alta solubilidade em água com capacidade de causar alterações à membrana celular aos quais danificam e inviabilizam as células. Outro fator relevante é o uso da temperatura na solução de vitrificação que contém o glicerol. Estudos apontam que esse crioprotetor, na temperatura de 25°C, consegue ultrapassar as membranas celulares realizando assim seu papel vitrificante, impedindo a formação de cristais de gelo no interior das células. E ao contrário, na temperatura de 0°C, o glicerol não consegue ultrapassar a membrana plasmática, não sendo tão eficiente na vitrificação.

## 2.4. CONCLUSÕES

Ápices caulinares de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen podem ser criopreservados com altas taxas de regeneração utilizando a técnica de vitrificação;

Os melhores percentuais de regeneração para ápices caulinares de *P. glomerata* após a criopreservação foram obtidos após o tratamento com a solução de vitrificação PVS<sub>4</sub>, na temperatura de 25°C, por 60 minutos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, F. DE. Indução de estruturas esféricas ou similares durante a cristalização da água por processos físicos ou químicos. **Ciência Agrotécnica**, v. 31, n. 3, p. 814-820, 2007.

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Crioconservação no melhoramento vegetal**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. 26 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 115).

ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. **Plant Genetic Resources Newsletter** 112: 9-18. (1997).

FERNANDES, L. D. R. **Aplicação de Técnicas de Conservação *in vitro* para a conservação de espécies ameaçadas**. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Biológica) - Universidade do Algarve - FARO, 2008.

FIGUEIREDO, M. do A.; VARAJÃO, A. F. D. C.; FABRIS, J. D.; LOUTFI, I. S.; CARVALHO, A. P. Alteração superficial e pedogeomorfologia no Sul do Complexo Bação - Quadrilátero Ferrífero (MG). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, p.713-729, 2004.

MARTINS, C. F; NICOLOSO, F. T. Micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.6, n.3, p.53-61, 2004.

MARTINKOVÁ, Z.; HONEK, A. The effect of cryopreservation on germination of dandelion seeds. **Plant Protection Science**, v.43, p.63-67, 2007.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **The American Journal of Physiology**, v.247, p.125-142, 1984.

NOGUEIRA, G. F. **Regeneração, conservação in vitro e estabilidade genômica em cana-de-açúcar** - 184 p. Tese (Doutorado em Agronomia / Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, 2013.

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

PORTO, J. M. P. **Criopreservação de calos, ápices caulinares e sementes de barbatimão**. 115 p. Tese (Doutorado em Agronomia / Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, 2013.

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

SANTOS, I.R.I. Criopreservação de Germoplasma Vegetal: a alternativa para a conservação a longo prazo. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** - nº 20 - maio/junho 2001.

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

SHARMA, S. D. Cryopreservation of somatic embryos – An overview. **Indian Journal of Biotechnology**, v.4, p.47-55, 2005.

SHIOBARA, Y., INOUE, S., KATO, K., *et al.* A nortriterpenoid, triterpenoid and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, Oxford, v.32, n.6, p.1527-1530, 1993.

SOUZA, A. C. de. **Organogênese e criopreservação in vitro de *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. O. Grose** - 88 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, 2014.

SURANTHRA, N.P.; GANTAIT, S.; SINNIHAH, U.R.; SUBRAMANIAM, S.; ALWEE, S.S.R.S.; ROOWI, S.H. Effect of loading and vitrification solutions on survival of cryopreserved oil palm polyembryoids. **Plant Growth Regul.** 66: 101–109. 2012.

TRESENA, N. L.; CAVALCANTI-MATA, M. E. R. M.; DUARTE, M. E. M.; MORAES, A. M. DE; DIAS, V. S. Qualidade fisiológica da semente de ipê rosa (*Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo) submetidas à criopreservação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.11, p.87-93, 2009.

VANDENBUSSCHE, B., WEYENS, G.; DE PROFT, M. Plant Cell Reports. Cryopreservation of in vitro sugar beet (*Beta vulgaris* L.) shoot tips by a vitrification technique. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 1064-1068, 2000.

VILARDO, A. F. R. M. **Criopreservação de plantas propagadas *in vitro* de *Cleome spinosa* Jacq. (Cleomaceae)**. 95 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes., 2015.

VOLK, G. M.; WALTERS, C. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. **Cryobiology**, San Diego, v. 52, n. 1, p. 48-61, 2006.

ZIMMER, C.R.; PIRES, S.M.; CÁRCAMO, M.C. et al. Efeitos da competição larval intra-específica sobre caracteres biométricos de *Muscina stabulans* (Fallén, 1817) (Diptera: Muscidae) em laboratório. **Arq. Inst. Biol.**, v.73, p.203-209, 2006.

### **CAPÍTULO III - CRIOPRESERVAÇÃO DE ÁPICES CAULINARES DE *Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN PELO MÉTODO DE GOTA VITRIFICAÇÃO**

A espécie *Pfaffia glomerata* pertence a família Amaranthaceae. Conhecida por suas propriedades medicinais, é utilizada como tranquilizante, anti-reumática, antidiarréica, anti-inflamatória, antidiabética, nos distúrbios gástricos, de anemia dentre muitos outros. A criopreservação é considerada o método ideal para conservação de germoplasma, pois permite o armazenamento de material biológico por longo período de tempo. Dessa forma o objetivo desse trabalho consistiu em definir um protocolo de criopreservação de ápices caulinares de *Pfaffia glomerata* pelo método de gota-vitrificação. Inicialmente foi realizado o isolamento dos explantes e colocados em meio de pré-cultivo por 18h. Após esse período foi realizado o teste de gota-vitrificação com as seguintes etapas: de saturação, exposição à PVS, congelamento em nitrogênio líquido (gotículas de PVS contendo explante sobre lâminas de alumínio), descongelamento, diluição e inoculação do material *in vitro*. O melhor resultado de sobrevivência das plântulas na solução de PVS<sub>2</sub> foi de 22%, na temperatura de 0°C no tempo de 60 minutos. Na solução de PVS<sub>3</sub> o melhor resultado foi 82% de regeneração, na temperatura de 0°C, no tempo de 60 minutos. Na solução de PVS<sub>4</sub> o melhor resultado de sobrevivência foi 32% tanto na temperatura de 25°C, 60 minutos, como na temperatura de 0°C no tempo de 40 minutos. Concluiu-se que a melhor metodologia de gota-vitrificação para conservar o germoplasma de *Pfaffia glomerata*, através de ápices caulinares foi com o uso de solução de PVS<sub>3</sub> no tempo de 60 minutos, na temperatura de 0°C.

Palavras - chave: Conservação de germoplasma; ginseng-brasileiro; nitrogênio líquido.

### 3.1.INTRODUÇÃO

A família Amaranthaceae possui 170 gêneros e cerca de 2.000 espécies, ocorrendo nos trópicos, subtropicais e regiões temperadas da América e da África. No Brasil, ocorrem 27 gêneros e 158 espécies dessa família (MARCHIORETTO *et al.*, 2015). Algumas espécies de Amaranthaceae destacam-se pelo uso medicinal, como as dos gêneros *Pfaffia* (MONTANARI, *et al.*, 1999), *Gomphrena* (MERCIER *et al.*, 1992) e *Hebanthe* (VIGO *et al.*, 2004).

As raízes de espécies do gênero *Pfaffia* são usadas na medicina popular brasileira, especialmente como tônico, afrodisíaco e no controle do diabetes. Ainda, com base em dados etnobotânicos, as raízes e folhas da planta têm sido utilizadas ancestralmente como estimulantes gerais, tranquilizante, antirreumática, antidiarréica, anti-inflamatória, antidiabética, febrífuga, cicatrizante interna e externa, anti-hemorróica, melhoria da visão e da memória e para o tratamento de distúrbios gástricos, artrite, artrose, anemia, astenia e dores (SILVA JÚNIOR e OSAIDA, 2005). Entre as espécies do gênero, *Pfaffia glomerata* é a de maior importância medicinal e comercial (VIGO *et al.*, 2004a; FIGUEIREDO *et al.*, 2004; ZIMMER *et al.*, 2006).

A criopreservação é considerada o método ideal para a conservação de germoplasma, por permitir o armazenamento de materiais biológicos por tempo indefinido, mantendo sua estabilidade genética e suas características fenotípicas, usando pouco espaço e requerendo pouca manutenção (ENGELMANN, 1997; CARVALHO e VIDAL, 2003).

Técnicas de criopreservação são aplicáveis a diferentes tipos de tecido com potencial de regeneração, sendo que para a formação de criobancos são mais utilizados ápices caulinares (REED, 2008; PANIS, 2009).

Dentre as técnicas de criopreservação tem-se a "droplet-vitrification" ou gota vitrificação, inicialmente desenvolvida para ápices caulinares de banana (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005). Essa técnica consiste em gotejar solução de vitrificação sobre os explantes acomodados em tiras de papel alumínio, que são imersas rapidamente em nitrogênio líquido. O uso de tiras de papel alumínio, um bom condutor de calor, e o contato direto das gotículas contendo os explantes com o nitrogênio líquido, durante o resfriamento ou com a solução de descarregamento e durante o aquecimento, permitem altas taxas de troca de temperatura (LEUNUFNA; KELLER, 2003). Altas taxas de resfriamento, cerca de 130 °C/min<sup>-1</sup> (TOWILL; BONNART, 2003), facilitam a vitrificação intracelular, enquanto

o reaquecimento rápido reduz a possibilidade de recristalização do gelo intracelular, conduzindo assim, à maior recuperação e sobrevivência do material congelado em nitrogênio líquido (KIM *et al.*, 2006; PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005).

A técnica de gota vitrificação tem sido utilizada para a criopreservação de ápices caulinares de distintas espécies de plantas herbáceas e lenhosas, como cultivares de *Rosa x hibrida* L. (HALMAGYI; PINKER, 2006), *Colocasia esculenta* var. *esculenta* (L.) Schott (SANT *et al.*, 2008), *Malus domestica* Borkh (HALMAGYI *et al.*, 2010), cultivares de lírio *Lilium x lancifolium*, *Lilium x longiflorum*, *Lilium x siberia* (CHEN *et al.*, 2011) e *Hancornia speciosa* Gomes (SANTOS *et al.*, 2015).

Devido à importância medicinal de *Pfaffia glomerata*, propõe-se nesse trabalho definir um protocolo de criopreservação pelo método de gota vitrificação de ápices caulinares da espécie.

## **3.2.METODOLOGIA**

### **3.2.1 Explantes**

Ápices caulinares com cerca de 2 mm de comprimento de *P. glomerata* foram isolados de plântulas cultivadas em caixas Magenta, contendo 30ml de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 0,02 mg/L de BAP (6-benzilaminopurina), 0,01 mg/L de ANA (ácido naftaleno acético) e 0,1 mg/L de GA<sub>3</sub> (ácido giberélico) por quinze dias, em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de 40 μm.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas (Figura 3.1).

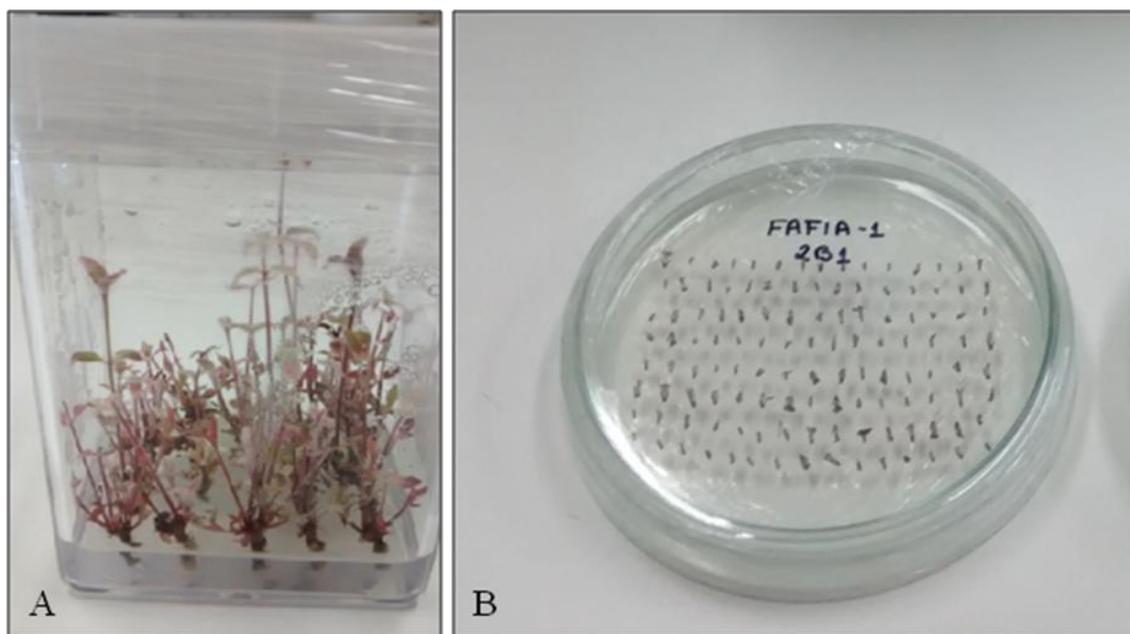


Figura 3.1 - Plântulas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen desenvolvidas em meio de cultura MS após 15 dias de inoculação. (A) e explantes em meio de pré-cultivo (B). Foto: Daniela Oliveira. 2015.

### 3.2.2 Gota vitrificação dos explantes

Nos testes de gota vitrificação foram utilizadas três soluções de vitrificação (*Plant Vitrification Solution*) esterilizadas por filtração: PVS<sub>2</sub> (30% de glicerol; 15% de etilenoglicol; 15% de dimetilsulfóxido e 0,4M de sacarose, diluídos em meio MS), PVS<sub>3</sub> (50% de glicerol; 50% de sacarose, diluídos em meio MS) e PVS<sub>4</sub> (35% de glicerol; 20% de etilenoglicol e 0,6M de sacarose, diluídos em meio MS) por três períodos de tempo distintos 20, 40 e 60 minutos e em duas temperaturas (25°C e 0°C). As etapas do processo de gota vitrificação foram (Figura 3.2):

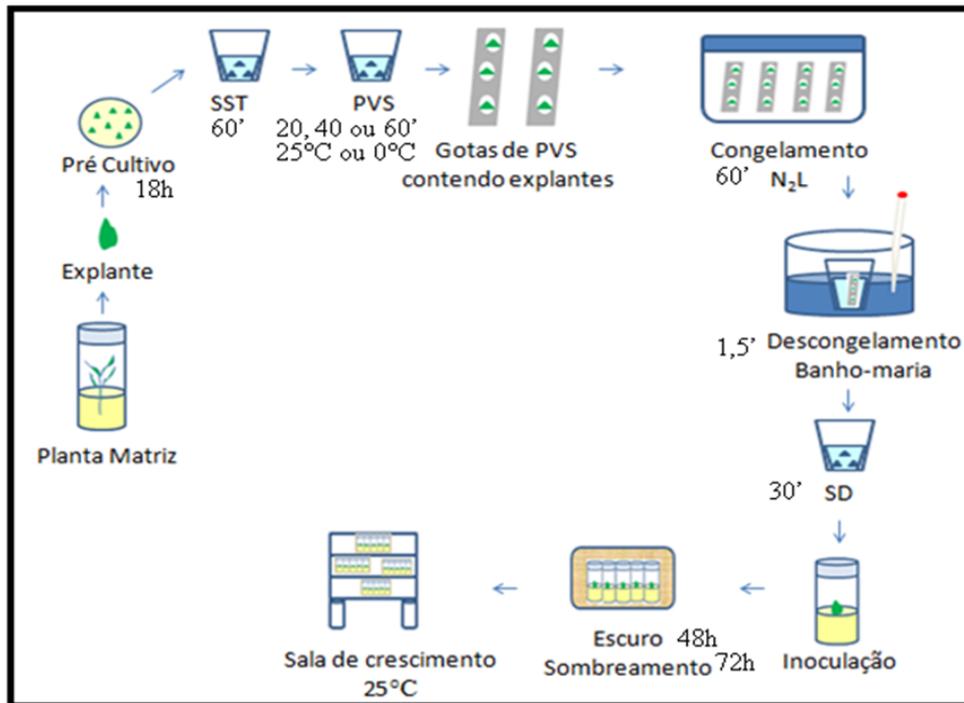


Figura 3.2 - Esquema ilustrativo das etapas da técnica de gota vitrificação utilizada em ápices caulinares de *Puffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. Esquema: Daniela Oliveira. 2016.

#### a) Pré-cultivo dos ápices caulinares

AC foram acondicionados em placas de Petri contendo papel filtro esterilizado e umedecido com 3,0 ml de água destilada esterilizada. Após o isolamento, os explantes foram transferidos para placas de Petri contendo 20 ml de meio MS sólido acrescido de 0,3M de sacarose, por um período de 18 h. Após essa etapa de pré-cultivo foi retirado um controle no total de 60 explantes (CPC) no qual foi realizada a inoculação e colocado em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de  $40 \mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas.

#### b) Saturação

Os explantes foram transferidos para recipientes contendo a solução de saturação (SST) composta por 10,0 ml de MS; 2,0 M glicerol e 0,4 M sacarose, deixando-a reagir por um total de tempo de 60 min. Após 30 min. a solução foi removida com o auxílio de uma pipeta e foram adicionados mais 10,0 ml de solução saturação. O material permaneceu imerso nessa solução por mais 30 min. Durante todo o processo, o material foi mantido a

temperatura de 25°C. Após essa etapa foi retirado um controle no total de 60 explantes (CS) no qual foi realizado a inoculação e colocado em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de 40  $\mu\text{m}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas.

#### c) Vitrificação

A solução de saturação foi drenada e foram adicionadas 10 ml de solução de vitrificação (PVS<sub>2</sub> ou PVS<sub>3</sub> ou PVS<sub>4</sub>) deixando-a agir por um total de tempo de 20 min. Após 10 min., a solução foi removida com o auxílio de uma pipeta e foram adicionados mais 10,0 ml de solução de vitrificação (PVS<sub>2</sub> ou PVS<sub>3</sub> ou PVS<sub>4</sub>). O material permaneceu imerso nessa solução por mais 10 min. Durante todo o processo, o material foi mantido às temperaturas de 25°C ou 0°C. Após essa etapa foi retirado um controle no total de 60 explantes (-N<sub>2</sub>L) no qual foi realizado a inoculação e colocado em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de 40  $\mu\text{m}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas.

#### d) Congelamento em nitrogênio líquido

A solução de vitrificação (PVS<sub>2</sub> ou PVS<sub>3</sub> ou PVS<sub>4</sub>) foi retirada dos recipientes com o auxílio de uma pipeta e foi gotejada solução de vitrificação fresca (PVS<sub>2</sub> ou PVS<sub>3</sub> ou PVS<sub>4</sub>) sobre os explantes acondicionados em lâminas de alumínio. As lâminas foram mergulhadas em nitrogênio líquido (velocidade de congelamento: ± 300°C/min.) por 60 min (Figura 3.3).



Figura 3.3 - Cabine de fluxo laminar onde foram conduzidos os testes de gota vitrificação com AC de *P. glomerata* (Spreng.) Pedersen. (A) e Explantes de *P. glomerata* (Spreng.) Pedersen dispostos sobre as lâminas de alumínio e envoltos por gotas de soluções de vitrificação. (B). Foto: Daniela Oliveira. 2015.

#### e) Descongelamento

O descongelamento foi rápido, as lâminas foram removidas do nitrogênio líquido e submergidas em banho-maria a 40°C (velocidade de descongelamento:  $\pm 250^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ ) em 10,0 ml de solução de diluição (MS líquido + 1,2 M sacarose). O recipiente foi agitado constantemente por aproximadamente 1,5 min. Após o descongelamento a solução foi removida juntamente com as lâminas de alumínio.

#### f) Diluição

Foram adicionados 10,0 ml de solução de diluição (MS líquido + 1.2 M sacarose) e deixando agir por 30 min, após esse período a solução foi removida com auxílio de uma pipeta. O processo foi conduzido à temperatura ambiente de  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

#### g) Inoculação

Os AC foram transferidos individualmente para tubos contendo meio MS básico para a regeneração dos explantes. O material permaneceu no escuro por 48 h e em luz difusa por 72 h em sala de crescimento de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de  $40 \mu\text{m}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas.

### 3.2.3. Análise estatística dos dados

O delineamento estatístico utilizado foi o fatorial, com quatro fatores, solução, tempo de exposição, temperatura e nitrogênio, sendo três soluções de vitrificação (PVS<sub>2</sub>, PVS<sub>3</sub> e PVS<sub>4</sub>), três tempos de exposição a essa solução de vitrificação (20 min, 40 min e 60 min), duas temperaturas referente a solução de vitrificação ( $25^{\circ}\text{C}$  e  $0^{\circ}\text{C}$ ) e nitrogênio (-N<sub>2</sub>L e +N<sub>2</sub>L). Estes 36 tratamentos (combinações entre os fatores) foram replicados seis vezes e as 216 unidades experimentais foram dispostas no delineamento inteiramente ao acaso.

Para a análise estatística, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade ( $p\leq 0,01$ ). As análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.00 e GENES, Cruz 2013. Após cada etapa do método de gota-vitrificação foi retirado um controle no total de sessenta explantes para cada controle, ao se isolar os explantes para experimento (Controle de Explante - CE), após a etapa de pré cultivo (Controle de pré cultivo - CPC), após a etapa de saturação (Controle de saturação - CS), após a PVS (Controle de vitrificação, -N<sub>2</sub>L).

### 3.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizada a análise de variância referente à regeneração dos explantes de *P. glomerata* após o teste de gota vitrificação, considerando todos os fatores, nitrogênio (-N<sub>2</sub>L, +N<sub>2</sub>L), temperatura (25°C, 0°C), tempo (20 min., 40 min., 60 min.) e suas interações. Conforme observado na Tabela 3.1, todas as interações triplas foram não significativas (p>0,01). Quanto às interações de segunda ordem, apenas nitrogênio x solução apresentou significância (p<0,01). Em decorrência disso foi necessário isolar o fator nitrogênio e analisar os demais fatores. Cada um deles pôde ser estudado isoladamente nos níveis de nitrogênio.

Tabela 3.1 - Análise de Variância dos resultados de regeneração de explantes de *P. glomerata* (Spreng.) Pedersen, considerando-se os fatores nitrogênio, temperatura da solução de vitrificação, tempo de exposição à solução de vitrificação e solução de vitrificação, bem como suas interações.

Fontes de variacao	Gl	F	Significância
Nitrogênio	1	2275,84	
Temperatura	1	0,73	
Tempo	2	10,60	
Solução	2	69,44	
Nitrogênio*temperatura	1	0,50	ns
Nitrogênio*tempo	2	14,01	0,0156 <sup>ns</sup>
Nitrogênio*solução	2	31,86	0,0035 *
Temperatura*tempo	2	8,79	0,0344 <sup>ns</sup>
Temperatura*solução	2	31,86	0,3074 <sup>ns</sup>
Tempo*Solução			0,0370 <sup>ns</sup>
Nitrogênio*temperatura*tempo	2	3,43	0,1357 <sup>ns</sup>
Nitrogênio*temperatura*solução	2	0,59	ns
Nitrogênio*tempo*solução	4	7,63	0,0371 <sup>ns</sup>
Resíduo	4		
Media geral	=	61,08	
Coefficiente de variação	=	7,32	

A análise de variância para o fator solução no nitrogênio 1 apresentou diferença significativa, com coeficiente de variação de 3.923 (Tabela 3.2). Pelo teste de Tukey as soluções PVS<sub>4</sub> e PVS<sub>3</sub> são superiores à PVS<sub>2</sub> (Tabela 3.3).

Tabela 3.2 - Análise de Variância considerando o fator solução de vitrificação no nitrogênio 1 (-N<sub>2</sub>L).

Fontes de variação	G.l.	F	Significância
Solução	2	9,61	0,002
Resíduo	15		
Coeficiente de variação	= 3,92		

Tabela 3.3 - Médias para o estudo do efeito de solução de vitrificação no nitrogênio 1 (-N<sub>2</sub>L).

Solução	Dados	Medias	Comparações
PVS <sub>4</sub>	6	100,00	A
PVS <sub>3</sub>	6	98,83	A
PVS <sub>2</sub>	6	91,16	B

Letras maiúsculas iguais nas linhas não diferem entre si P>1%, pelo Teste de Tukey.

Pela análise de variância considerando o fator solução de vitrificação na presença de nitrogênio 2 (+N<sub>2</sub>L) apresentou diferença significativa entre as soluções de vitrificação (Tabela 3.4). Pelo teste de Tukey com médias 44.16 para solução PVS<sub>3</sub>, 23.50 para solução PVS<sub>4</sub> e 8.83 na solução PVS<sub>2</sub> (Tabela 3.5).

Tabela 3.4 - Análise de Variância considerando o fator solução de vitrificação no Nitrogênio 2 (+N<sub>2</sub>L).

Fontes de variação	G.l.	F	Significância
Solução	2	9,13	0,002
Resíduo	15		
Coeficiente de variação	= 56,40		

Tabela 3.5 - Médias para o estudo do efeito de de vitrificação no Nitrogênio 2 (+N<sub>2</sub>L).

Solução	Dados	Medias	Comparações
PVS <sub>3</sub>	6	44,16	A
PVS <sub>4</sub>	6	23,50	A B
PVS <sub>2</sub>	6	8,83	B

Letras maiúsculas iguais nas linhas não diferem entre si P>1%, pelo Teste de Tukey.

Pela análise de variância considerando a regeneração em função de nitrogênio há diferença significativa (Tabela 3.6). Pelo teste de tukey com médias 91,17 para nitrogênio 1(-N<sub>2</sub>L), 8,83 para nitrogênio 2 (+N<sub>2</sub>L) (Tabela 3.7).

Tabela 3.6 - Análise de Variância considerando a regeneração em função de nitrogênio líquido na solução de vitrificação1 (PVS<sub>2</sub>).

Fontes de variação	G.l.	F
Nitrogênio	1	318,91*
Resíduo	10	
Coeficiente de variação	=	15,97

\* Significativo ao nível de 1%.

Tabela 3.7 - Médias para o estudo do efeito de nitrogênio líquido sobre a solução de vitrificação 1 (PVS<sub>2</sub>).

Nitrogênio	Dados	Medias
1	6	91,16
2	6	8,83

De acordo com a análise de variância considerando a regeneração em função de nitrogênio líquido na solução de vitrificação PVS<sub>3</sub> houve diferença significativa (Tabela 3.8). Segundo teste de Tukey, nitrogênio líquido1 (-N<sub>2</sub>L) apresenta média de 98.83 e nitrogênio líquido 2 (+N<sub>2</sub>L) 44.16 (Tabela 3.9).

Tabela 3.8 - Análise de Variância considerando a regeneração em função de nitrogênio líquido na solução de vitrificação PVS<sub>3</sub>.

Fontes de variação	G.l.	F	Significância
Nitrogênio	1	41,16	0,00008*
Resíduo	10		
Coeficiente de variação	=	20,63	

\* Significativo ao nível de 1%.

Tabela 3.9 - Médias para o estudo do efeito de nitrogênio líquido na solução de vitrificação PVS<sub>3</sub>.

Nitrogênio	Dados	Medias
1	6	98,83
2	6	44,16

Conforme análise de variância considerando a regeneração em função de nitrogênio líquido na solução de vitrificação PVS<sub>4</sub> houve diferença significativa (Tabela 3.10). Segundo teste de tukey nitrogênio líquido 1 (-N<sub>2</sub>L) apresenta média de 100,00 e nitrogênio líquido 2 (+N<sub>2</sub>L) 23,50 (Tabela 3.11).

Tabela 3.10 - Análise de Variância considerando a regeneração em função de nitrogênio líquido na solução de vitrificação PVS<sub>4</sub>.

Fontes de variação	G.l.	F	Significância
Nitrogênio	1	348,69	0.00000*
Resíduo	10		
Coefficiente de variação	=	11,49	

\* Significativo ao nível de 1%.

Tabela 3.11 - Médias para o estudo do efeito de nitrogênio líquido na solução de vitrificação PVS<sub>4</sub>.

Nitrogênio	Dados	Medias
1	6	100,00
2	6	23,50

A regeneração dos AC de *P. glomerata* tratados com solução de vitrificação PVS<sub>2</sub> a 25°C por 20 min. foram de 97% para os explantes não congelados (-N<sub>2</sub>L) e 19% para os congelados (+N<sub>2</sub>L). Para PVS<sub>2</sub> a 25°C por 40 min., 90% de regeneração para os explantes não congelados (-N<sub>2</sub>L) e 0% para os congelados (+N<sub>2</sub>L). Para PVS<sub>2</sub> a 25°C por 60 min., 89% de regeneração para os explantes não congelados (-N<sub>2</sub>L) e 5% para os congelados (+N<sub>2</sub>L) (Tabela 3.12, Figura 3.4). Por outro lado, a regeneração dos explantes tratados com PVS<sub>2</sub> a 0°C por 20 min. foram de 84% de regeneração para os explantes não congelados (-N<sub>2</sub>L) e 0% para os congelados (+N<sub>2</sub>L). Para PVS<sub>2</sub> a 0°C por 40 min, 87% de regeneração para os explantes não congelados (-N<sub>2</sub>L) e 7% para os congelados (+N<sub>2</sub>L). Para PVS<sub>2</sub> a 0°C por 60 min., 100% de regeneração para os explantes não congelados (-N<sub>2</sub>L) e 22% para os congelados (+N<sub>2</sub>L) (Tabela 3.12, Figura 3.5).

Tabela 3.12 - Percentuais de regeneração de ápices caulinares de *P. glomerata* (Spreng.) Pedersen tratados com solução de vitrificação PVS<sub>2</sub> a 25°C e 0°C.

Tempo de exposição (min.)	25°C		0°C	
	-N <sub>2</sub> L(%)	+N <sub>2</sub> L(%)	-N <sub>2</sub> L(%)	+N <sub>2</sub> L(%)
20	97	19	84	0
40	90	0	87	7
60	89	5	100	22

-N<sub>2</sub>L Controle, sem congelamento; +N<sub>2</sub>L congelado em nitrogênio líquido.

Resultados semelhantes foram observados ao se adotar a técnica de gota vitrificação com ápices caulinares de videira. A interação entre tempo de desidratação em PVS<sub>2</sub> e exposição ao nitrogênio líquido interferiu negativamente sobre ao poder de regeneração dos explantes. Maior o tempo de desidratação em PVS<sub>2</sub> menor a capacidade de regeneração dos explantes de videira (MARKOVIĆ *et al.*, 2013)

Entretanto, para *Galanthus elwsi* (planta ornamental fura neve gigante) o tempo de desidratação em PVS<sub>2</sub> (20 e 30 min) não comprometeu a sobrevivência dos explantes após congelamento em nitrogênio líquido (MAŚLANKA; PANIS; BACH, 2013).

Segundo Panis *et al.* (2011), o tratamento com PVS<sub>2</sub> varia consideravelmente entre as espécies e quanto mais prolongado o tempo de exposição mais letal às células. Assim sendo, os melhores tempos de exposição às soluções de vitrificação foram de 40 min. para *Musa spp.* (PANIS *et al.*, 2005), 20 min. para *Rosa hybrida* L. (HALMAGYI e PINKER, 2006), 60 min para *Malus domestica* Borkh. (CONDELLO *et al.*, 2011), 30 min para *Byrsonima intermedia* A. Juss (SILVA *et al.*, 2013), 20 min. para *Rosa agrestis*, *R. canina* e *R. dumalis* e de 30 min. para *Rosa rubiginosa* (PAWLOWSKA e SZEWCZYK-TARANEK, 2015).

Em AC de *P. glomerata* a combinação dos fatores tempo de exposição à PVS<sub>2</sub>, temperatura de exposição e congelamento em nitrogênio, interferiram na sobrevivência do material. A solução de vitrificação PVS<sub>2</sub> contém sacarose, glicerol, etilenoglicol e DMSO, esses componentes causaram danos celulares aos explantes, resultando em uma baixa regeneração dos AC de *P. glomerata*. A maior porcentagem de regeneração com o uso dessa solução de vitrificação ocorreu na temperatura de 0°C, fato esse que está relacionado ao resfriamento da PVS facilitando assim a vitrificação. O desenvolvimento do material após desidratação em PVS<sub>2</sub> em duas temperaturas e exposição ou não em nitrogênio líquido encontra-se nas Figuras 7 e 8.

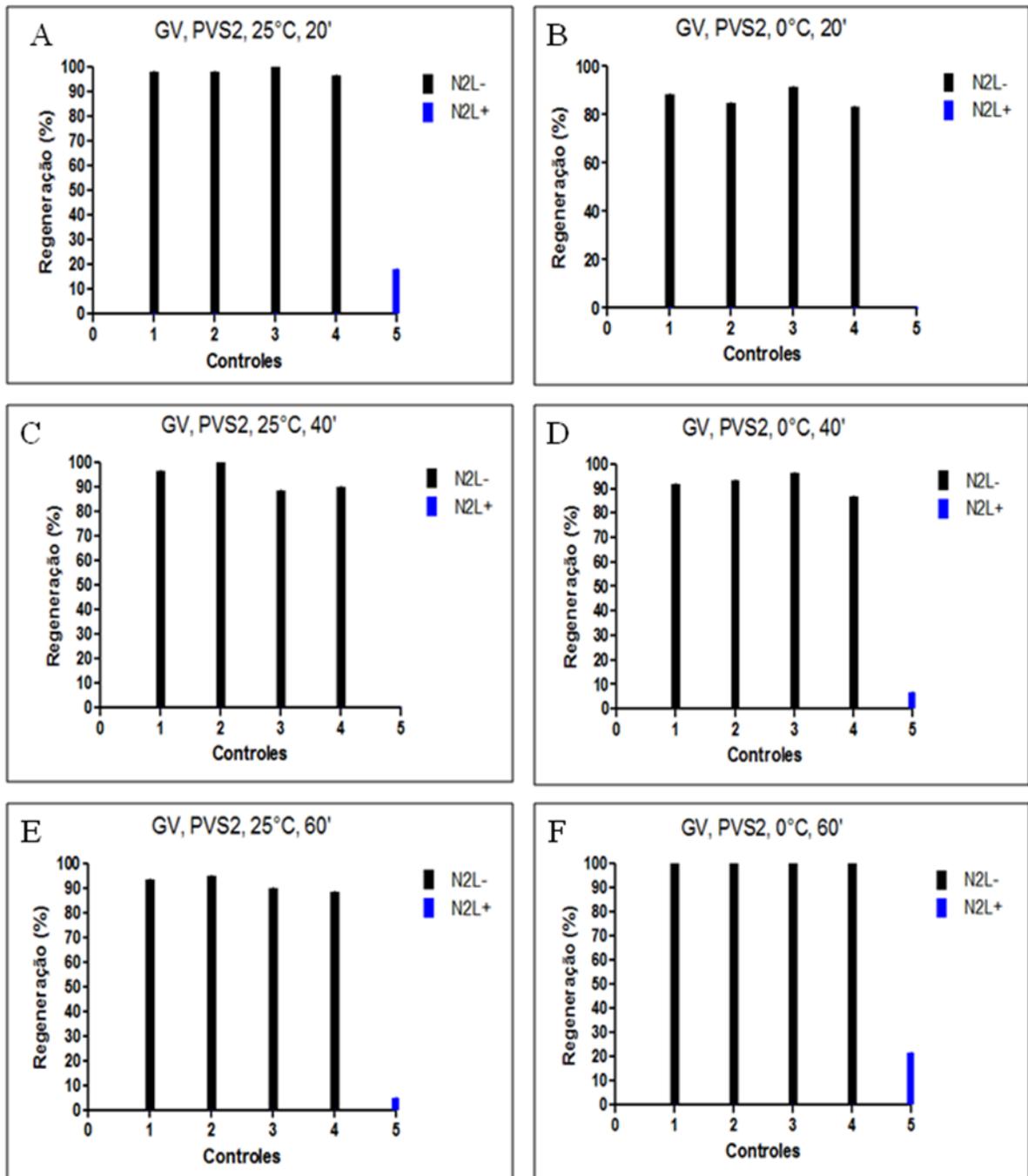


Figura 3.4 - Percentuais de regeneração de AC de *P. glomerata* (Spreng.) Pedersen tratados com solução de vitrificação PVS<sub>2</sub> em diferentes condições. A - 25°C, 20 min.; B - 0°C, 20 min.; C - 25°C, 40 min.; D - 0°C, 40 min.; E - 25°C, 60 min.; F - 0°C, 60 min. Controle 1- controle de explante; 2 - controle de pré cultivo; 3 - controle de saturação; 4 - sem congelar (N<sub>2</sub>L-) e 5 - congelado (N<sub>2</sub>L+).

Plântulas de *P. glomerata* após o teste de gota vitrificação na solução de PVS<sub>2</sub> seguem na Figura 3.5. Plântulas após criopreservação em nitrogênio líquido na solução de PVS<sub>2</sub>, a 25°C por 20 e 60 minutos e plântulas após criopreservação em nitrogênio líquido na solução de PVS<sub>2</sub>, a 0°C por 40 e 60 minutos encontram-se na Figura 3.6.

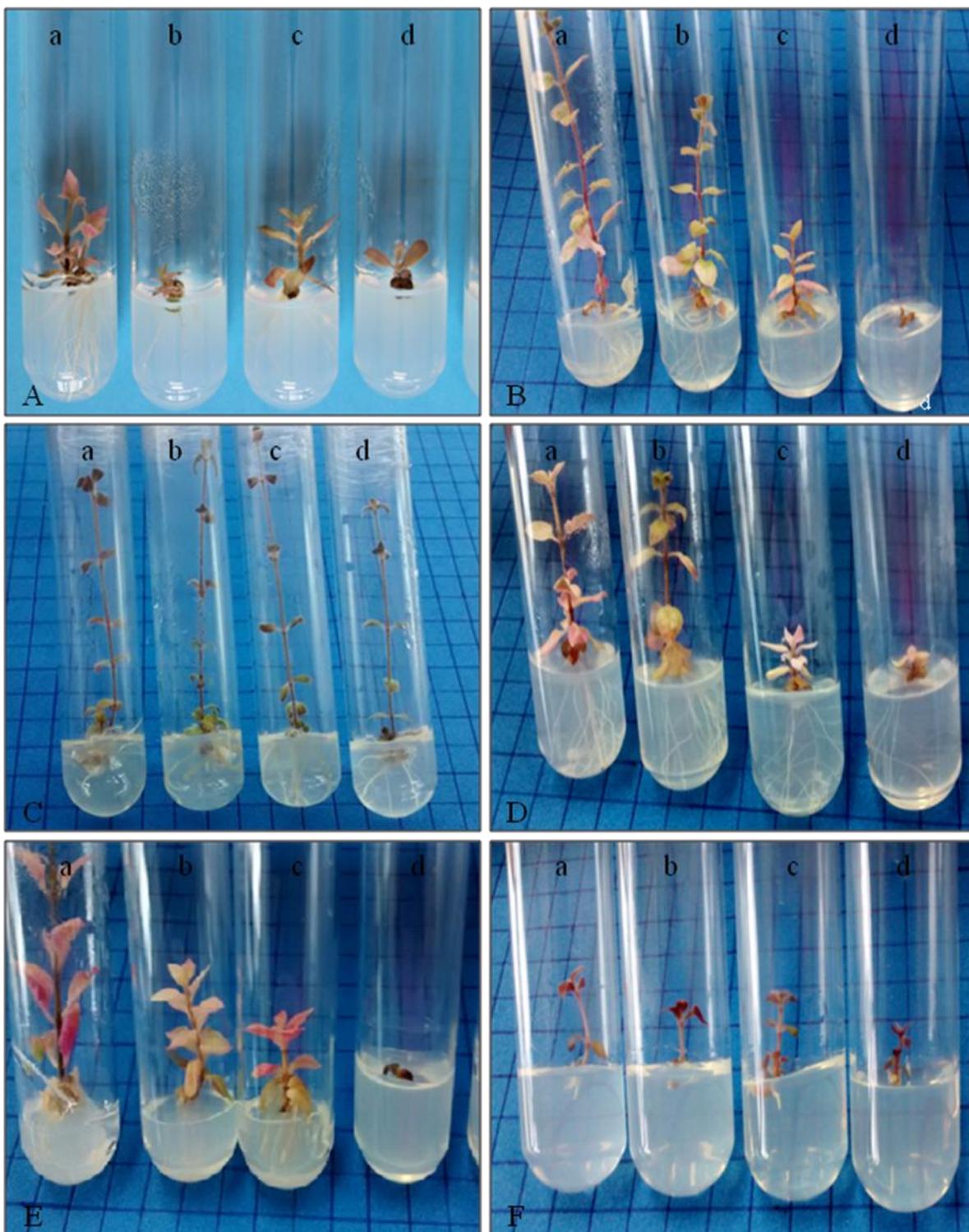


Figura 3.5 - Plântulas de *P. glomerata* (Spreng.) Pedersen desenvolvidas após tratamento com solução de vitrificação PVS<sub>2</sub>. A - 25°C por 20 min.; B - 0°C por 20 min.; C - 25°C por 40 min.; D - 0°C por 40 min.; E - 25°C por 60 min.; F - 0°C por 60 min. Controles: a - controle de explante, b - controle de pré cultivo, c - controle de saturação, d - controle de vitrificação (N2L-). Foto: Daniela Oliveira. 2016.



Figura 3.6 - Regeneração de explantes de *P. glomerata* (Spreng.) Pedersen após tratamento em solução de vitrificação PVS<sub>2</sub>, 25°C por 20 minutos (A), 0°C por 40 minutos (B) 25°C e por 60 minutos (C) e 0°C 60 minutos (D) seguido de congelamento em nitrogênio líquido. Foto: Daniela Oliveira. 2016.

A regeneração dos explantes de *P. glomerata* tratados com a solução de vitrificação PVS<sub>3</sub> a 25°C por 20 min. correspondem a 100% (-N<sub>2</sub>L) e 32% (+N<sub>2</sub>L). Para os explantes submetidos à desidratação em PVS<sub>3</sub> à temperatura de 25°C por 40 min., os percentuais de regeneração foram de 94% (-N<sub>2</sub>L) e 50% (+N<sub>2</sub>L). Para PVS<sub>3</sub> a 25°C por 60 min., 99% (-N<sub>2</sub>L) e 39% (+N<sub>2</sub>L). O processo de desidratação dos explantes conduzido em solução de vitrificação PVS<sub>3</sub> a 0°C por 20 min., 100% de regeneração para os explantes não congelados (-N<sub>2</sub>L) e 22% para os congelados (+N<sub>2</sub>L). Para PVS<sub>3</sub> a 0°C por 40 min., 100% de regeneração para os explantes não congelados (-N<sub>2</sub>L) e 82% para os congelados (+N<sub>2</sub>L).

Para PVS<sub>3</sub> a 0°C por 60 min., 100% de regeneração para os explantes não congelados (-N<sub>2</sub>L) e 40% para os congelados (+N<sub>2</sub>L) (Tabela 3.13 e Figura 3.7).

Tabela 3.13 - Resultado Percentuais de regeneração de ápices caulinares de *P. glomerata* (Spreng.) Pedersen tratados com solução de vitrificação PVS<sub>3</sub>, 25°C e 0°C.

Tempo de exposição (min.)	25°C		0°C	
	-N <sub>2</sub> L(%)	+N <sub>2</sub> L(%)	-N <sub>2</sub> L(%)	+N <sub>2</sub> L(%)
20	100	32	100	22
40	94	50	100	82
60	99	39	100	40

-N<sub>2</sub>L Controle, sem congelamento; +N<sub>2</sub>L congelado em nitrogênio líquido.

Comparando-se o efeito do tratamento com PVS<sub>2</sub> e PVS<sub>3</sub> sobre a regeneração dos explantes de *P. glomerata* tem-se que a solução de vitrificação PVS<sub>3</sub> foi mais favorável aos explantes congelados e não congelados. Para o material submetido ao congelamento em nitrogênio líquido, o melhor tratamento foi obtido ao se desidratar os explantes à temperatura de 0°C por 40min., que resultou em um percentual de regeneração de 82%. Esse tratamento mostrou-se bastante promissor para futuras ações de conservação em longo prazo de germoplasma de *P. glomerata*. Nota-se que na solução de vitrificação PVS<sub>3</sub> as maiores taxas de regeneração dos AC ocorreu no tempo de 40 min., após esse tempo a taxa de regeneração foi inferior, pode-se inferir que a solução crioprotetora tenha sido tóxica a nível celular no tempo maior de exposição a essa solução.

Resultados positivos foram obtidos com explantes de porta enxerto de cereja (*Prunus cerasus* x *Prunus canescens*) desidratados em PVS<sub>3</sub> por 60 min. A sobrevivência dos explantes foi de 95% e a regeneração após congelamento foi de 40% (RUŽIĆ; VUJOVIĆ; CEROVIĆ, 2013).

Com explantes de *P. glomerata* não se considerou apenas a sobrevivência, mas sim o desenvolvimento de plântulas normais após desidratação em PVS<sub>3</sub> em duas temperaturas e exposição ou não em nitrogênio líquido, conforme demonstrado nas Figuras 3.8 e 3.9.

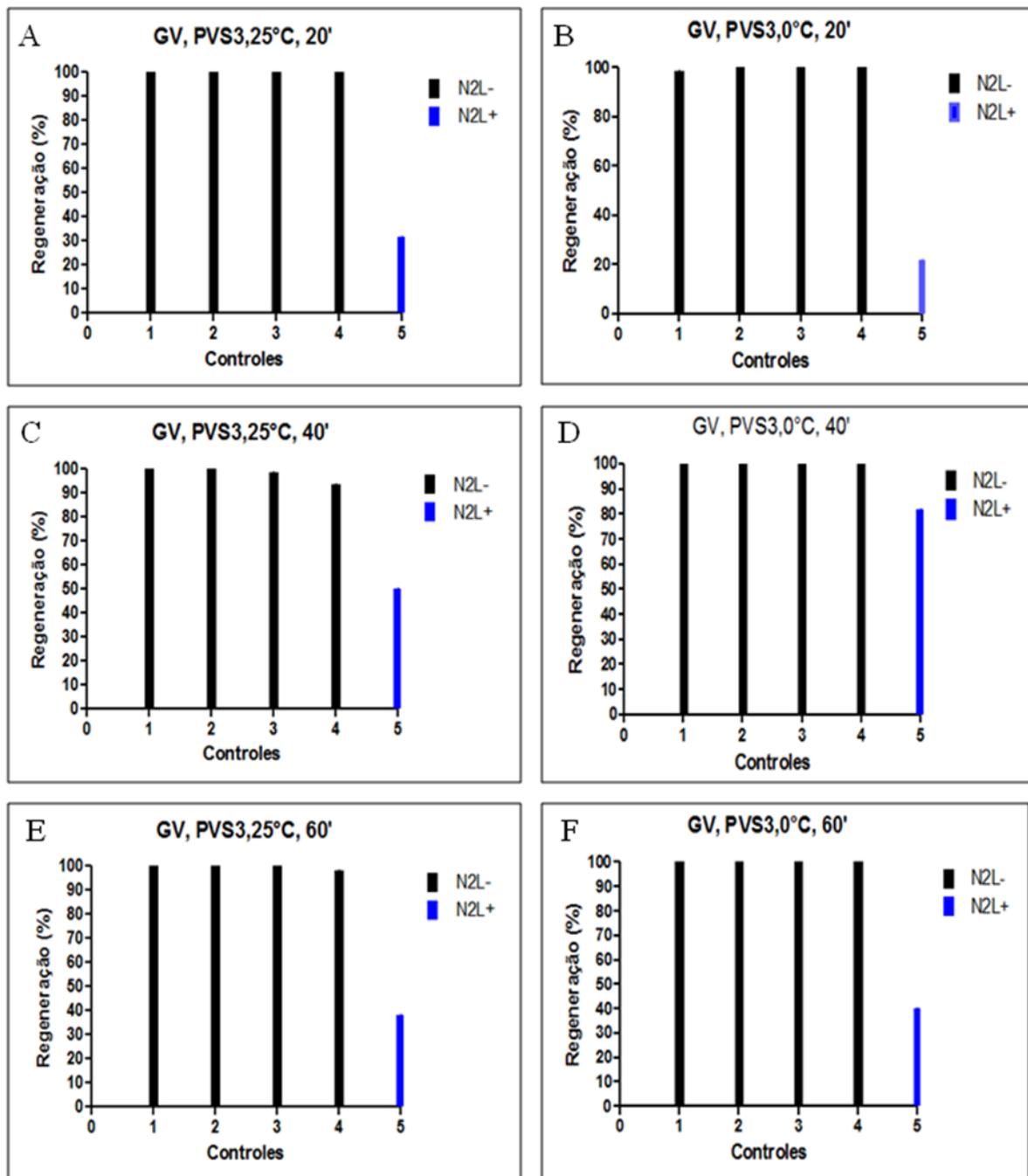


Figura 3.7 - Porcentagem de regeneração de ápices *P. glomerata* no experimento de gota vitrificação. A - PVS<sub>3</sub>, 25°C, 20 min.; B - PVS<sub>3</sub>, 0°C, 20 min.; C - PVS<sub>3</sub>, 25°C, 40 min.; D - PVS<sub>3</sub>, 0°C, 40 min.; E - PVS<sub>3</sub>, 25°C, 60 min.; F - PVS<sub>3</sub>, 0°C, 60 min. Controle 1- controle de explante; 2 - controle de pré cultivo; 3 - controle de saturação; 4 - sem congelar (N<sub>2</sub>L-) e 5 - congelado (N<sub>2</sub>L+).

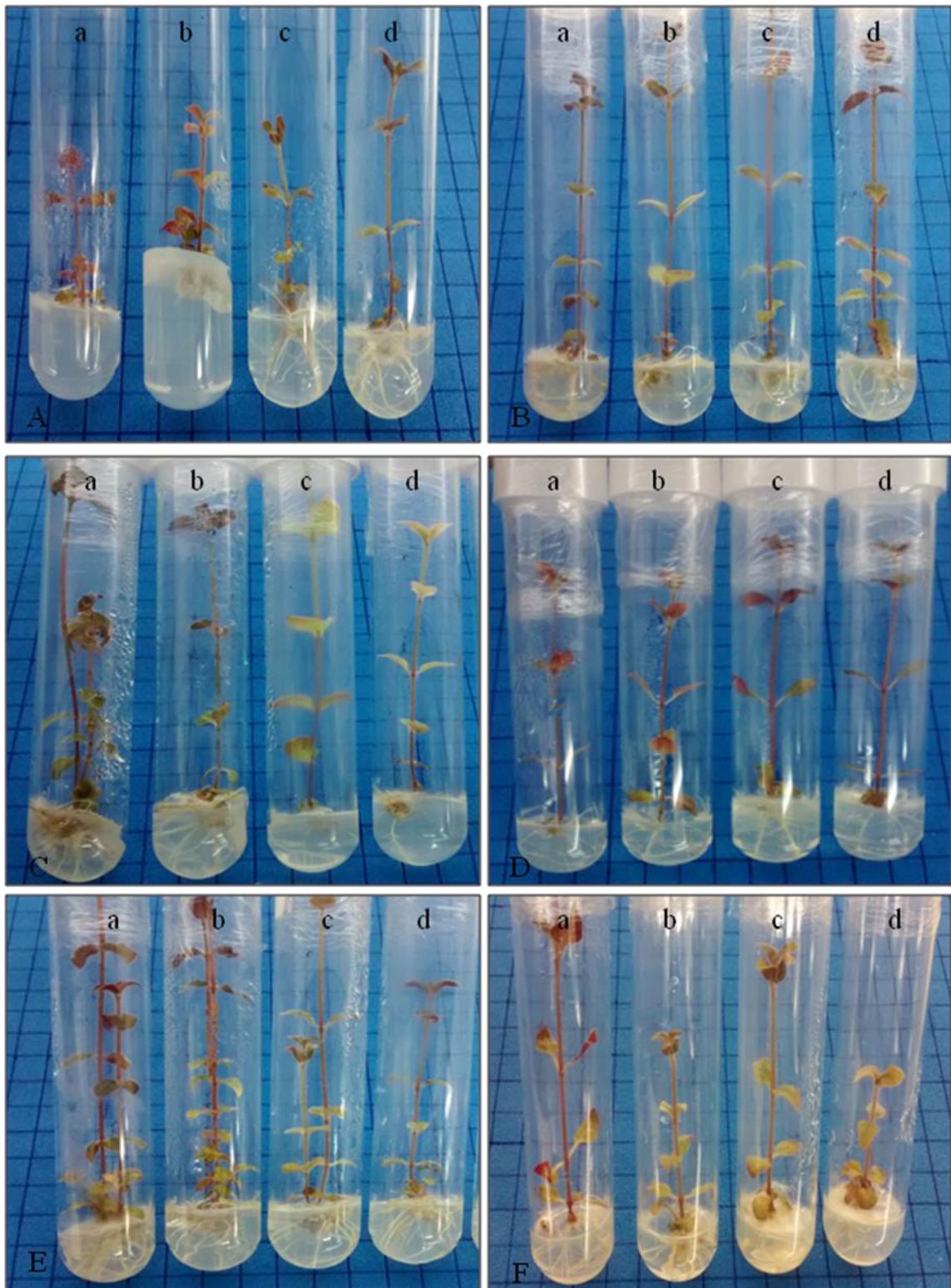


Figura 3.8 - Plântulas de *P. glomerata* após o experimentos de gota vitrificação. A - PVS<sub>3</sub>, 25°C por 20 minutos; B - PVS<sub>3</sub>, 0°C por 20 minutos; C - PVS<sub>3</sub>, 25°C por 40 minutos; D - PVS<sub>3</sub>, 0°C por 40 minutos; E - PVS<sub>3</sub>, 25°C por 60 minutos; F - PVS<sub>3</sub>, 0°C por 60 minutos. Com seus respectivos controles: a - controle de explante, b - controle de pré cultivo, c - controle de saturação, d - controle de vitrificação (N2L-). Foto:

Daniela Oliveira. 2016.

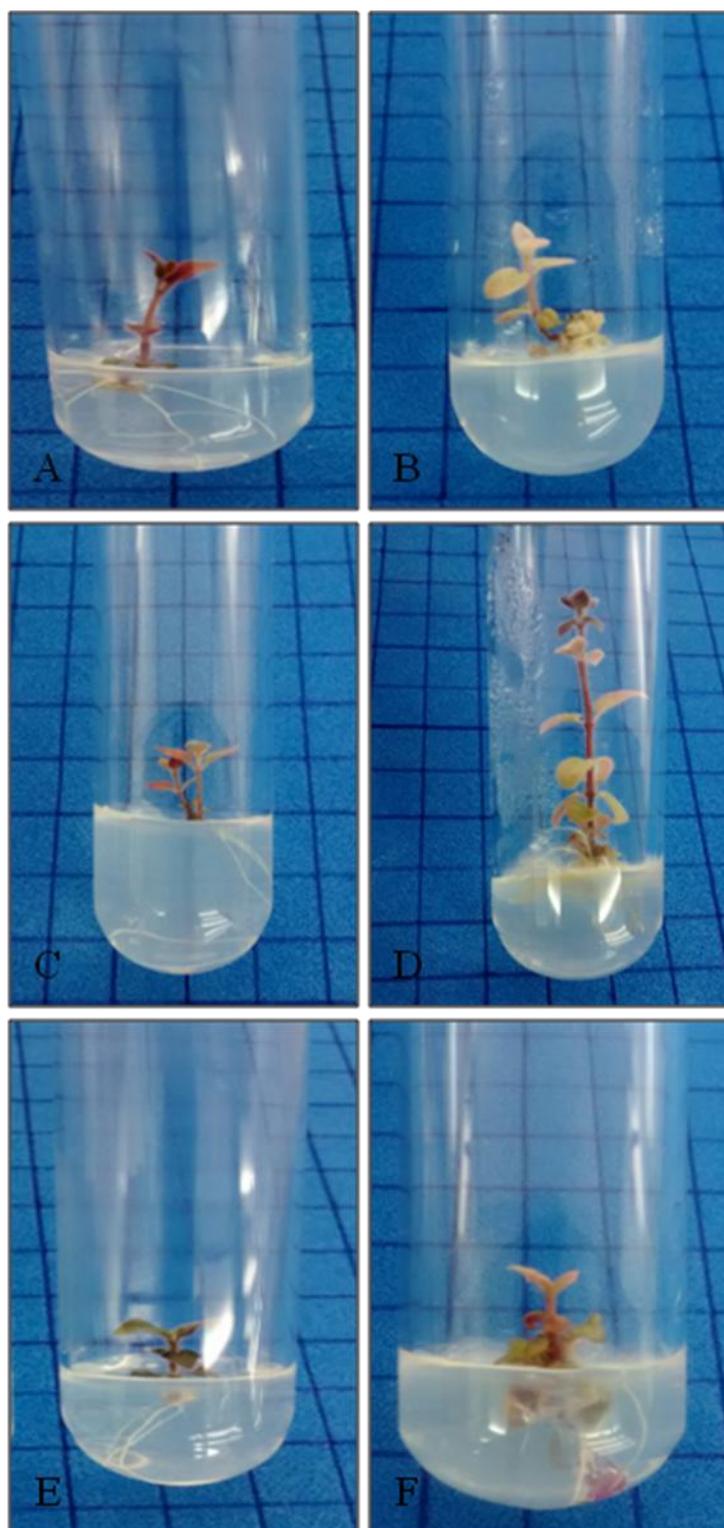


Figura 3.9 - Plântulas de *P. glomerata* após o congelamento. A - PVS<sub>3</sub>, 25°C por 20 minutos; B - PVS<sub>3</sub>, 0°C por 20 minutos; C - PVS<sub>3</sub>, 25°C por 40 minutos; D - PVS<sub>3</sub>, 0°C por 40 minutos; E - PVS<sub>3</sub>, 25°C por 60 minutos; F - PVS<sub>3</sub>, 0°C por 60 minutos. Foto: Daniela Oliveira. 2016.

A regeneração dos explantes de *P. glomerata* desidratados em solução de vitrificação PVS<sub>4</sub> a 25°C por 20 min. corresponde a 100% (-N<sub>2</sub>L) e 12% (+N<sub>2</sub>L). Mantendo-se a temperatura de 25°C por 40 min., a regeneração foi de 100% (-N<sub>2</sub>L) e 30% (+N<sub>2</sub>L). Alterando-se o tempo de desidratação dos explantes para 60 min. a 25°C, a regeneração foi de 100% (-N<sub>2</sub>L) e 32% para os congelados (+N<sub>2</sub>L). Ao se desidratar os explantes com a solução PVS<sub>4</sub> à temperatura de 0°C por 20 min., os percentuais de regeneração foram de 100% (-N<sub>2</sub>L) e 10% (+N<sub>2</sub>L). Com o tempo de desidratação de 40 min., foram obtidos 100% de regeneração de explantes não congelados e 32% para os congelados. A desidratação por 60 min. resultou em 100% de regeneração (-N<sub>2</sub>L) e 25% de regeneração (+N<sub>2</sub>L) (Tabela 3.14 e Figura 3.10).

Com explantes de *P. glomerata* não se considerou apenas a sobrevivência, mas sim o desenvolvimento de plântulas normais após desidratação em PVS<sub>4</sub> em duas temperaturas e exposição ou não em nitrogênio líquido, conforme demonstrado nas Figuras 3.11 e 3.12.

Tabela 3.14 - Percentuais de regeneração de ápices caulinares de *P. glomerata* (Spreng.) Pedersen tratados com solução de vitrificação PVS<sub>4</sub>, 25°C e 0°C.

Tempo de exposição (min.)	25°C		0°C	
	-N <sub>2</sub> L(%)	+N <sub>2</sub> L(%)	-N <sub>2</sub> L(%)	+N <sub>2</sub> L(%)
20	100	12	100	10
40	100	30	100	32
60	100	32	100	25

-N<sub>2</sub>L Controle, sem congelamento; +N<sub>2</sub>L congelado em nitrogênio líquido.

A solução de vitrificação PVS<sub>4</sub> composta por 35% de glicerol, 20% de etilenoglicol e 0,6 M de sacarose, possivelmente, não eficiente para desidratar os AC de *P. glomerata* e consequentemente deter os prováveis danos ou injúrias extra e intracelular durante o congelamento. O sucesso da criopreservação depende de uma combinação de fatores, em que a água assume papel preponderante. Esses fatores ao interagirem impedem a formação de cristais de gelo no interior dos tecidos, mudanças na estrutura celular, deterioração do plasmalema e alterações enzimáticas (ENGELMANN, 2011; NIINO; ARIZAGA, 2015; RAHMAH *et al.*, 2015). De acordo com observações feitas MAZUR (1984) e SURANTHRAN *et al.* (2012), quando o tempo de imersão em solução de vitrificação não é suficiente para promover a remoção da água livre, células podem sofrer danos irreversíveis nas membranas devido aos efeitos da cristalização quando expostas ao nitrogênio líquido. Os baixos percentuais de regeneração dos explantes de *P. glomerata*

tratados com PVS<sub>4</sub>, seguindo-se com congelamento em nitrogênio líquido, é provável que ajustes nas concentrações dos crioprotetores devem ser feitos.

Os crioprotetores como DMSO (dimetilsufóxido) e mesmo o etilenoglicol podem ser tóxicos às células, resultado em morte celular, especialmente se a imersão ocorrer em temperaturas superiores a 0°C ou se o período de exposição for muito prolongado (NIIO; ARIZAGA, 2015; PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005; FULLER, 2004). No teste de gota vitrificação utilizando-se a solução de vitrificação PVS<sub>2</sub>, que possui em sua formulação 15% de DMSO, desidratar AC de *P. glomerata*, foram obtidos baixos percentuais de regeneração dos explantes. Não houve regeneração para a combinação de tratamentos 20 min. a 0°C e 40 min. a 25°C após exposição ao nitrogênio líquido. Em contraste, houve regeneração de 19% e 22%, nos tratamentos de 20 min. a 25°C e 60 min. a 0°C, respectivamente.

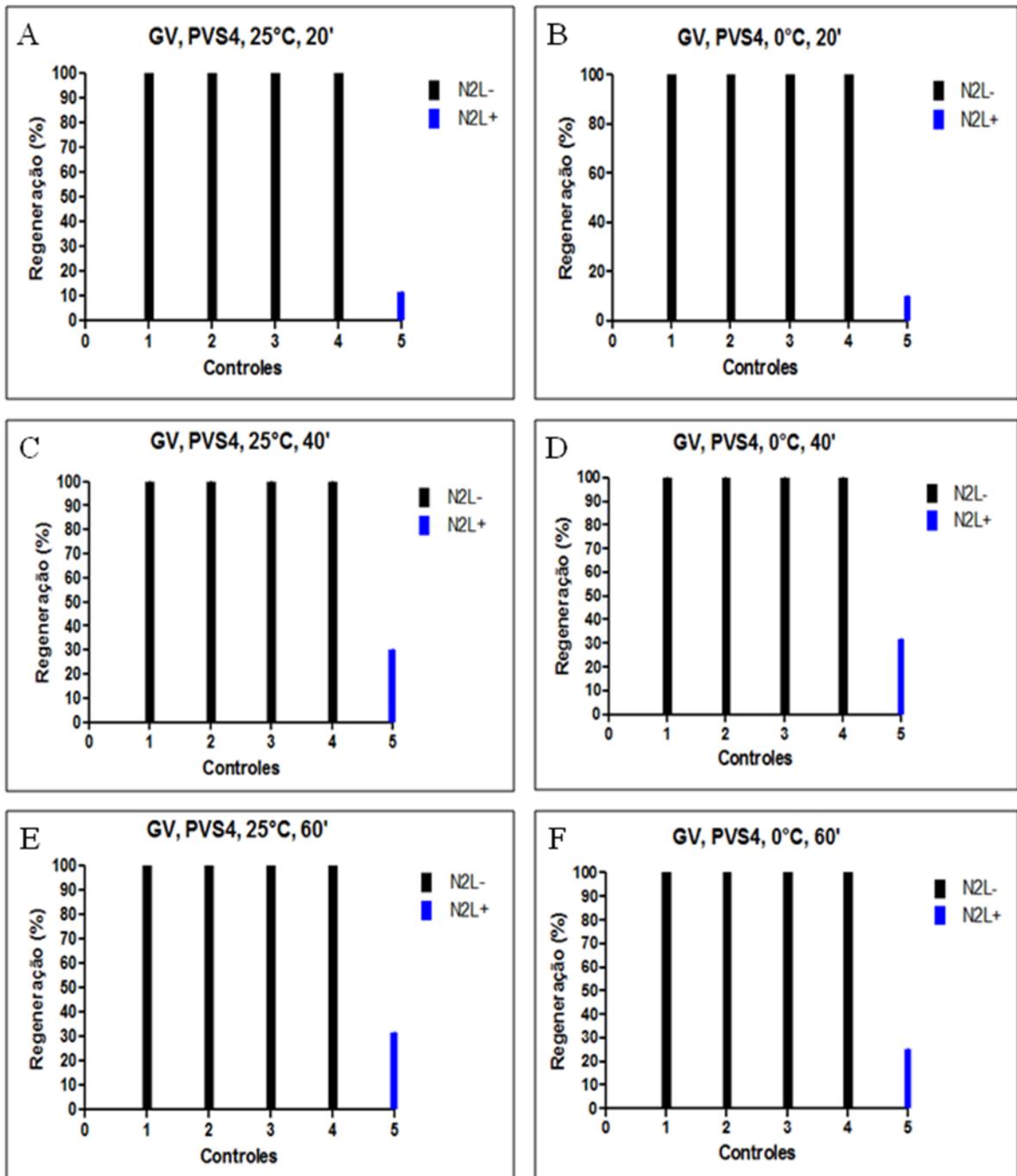


Figura 3.10 - Percentuais de regeneração de AC de *P. glomerata* (Spreng.) Pedersen tratados com solução de vitrificação PVS<sub>4</sub> em diferentes condições: A - 25°C, 20 min.; B - 0°C, 20 min.; C - 25°C, 40 min.; D - 0°C, 40 min.; E - 25°C, 60 min.; F - 0°C, 60 min. Controle 1- controle de explante; 2 - controle de pré cultivo; 3 - controle de saturação; 4 - sem congelar (N<sub>2</sub>L-) e 5 - congelado (N<sub>2</sub>L+).

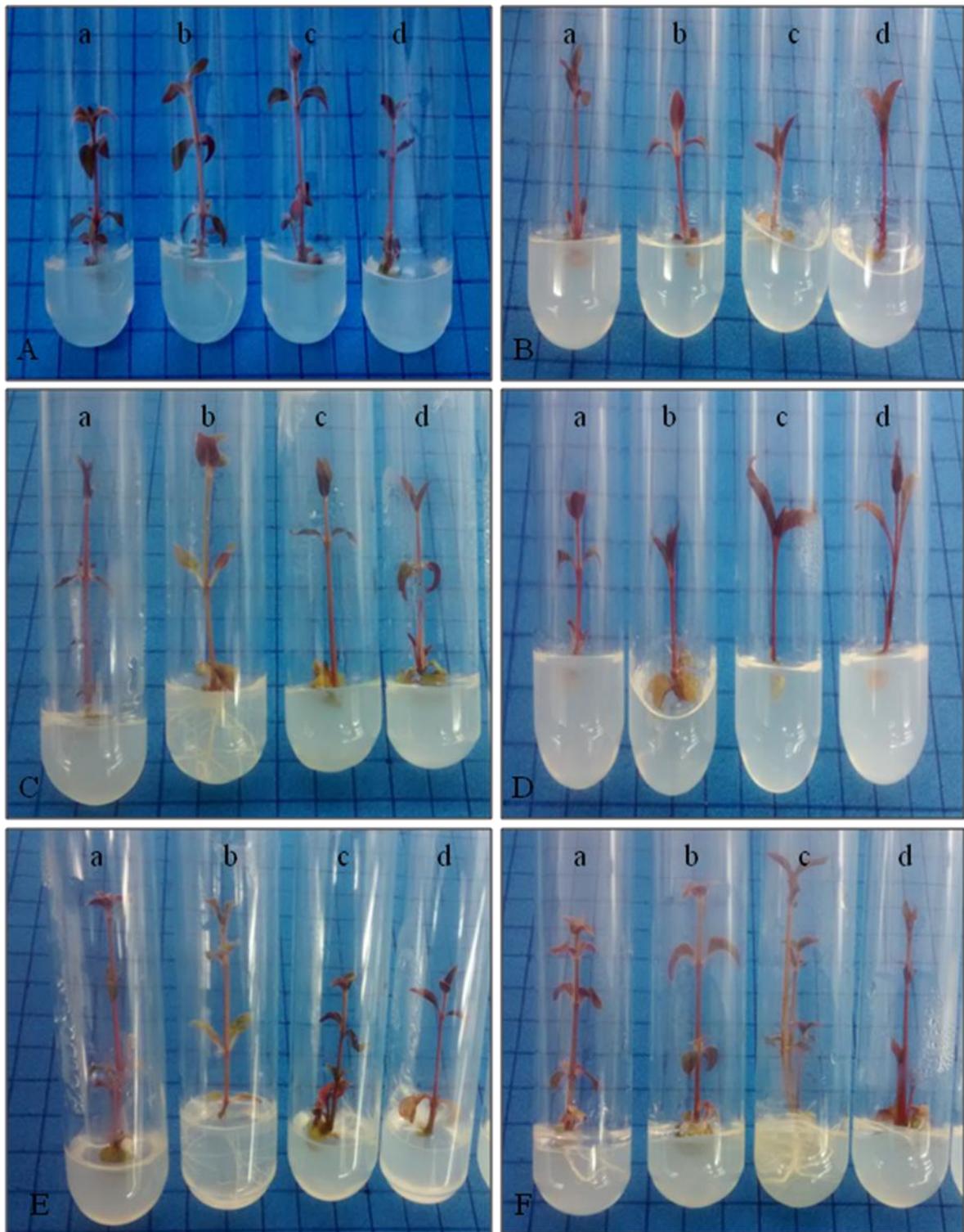


Figura 3.11 - Plântulas de *P. glomerata* (Spreng.) Pedersen desenvolvidas após tratamento com solução de vitrificação PVS<sub>4</sub>. A - 25°C por 20 min.; B - 0°C por 20 min.; C - 25°C por 40 min.; D - 0°C por 40 min.; E - 25°C por 60 min.; F - 0°C por 60 min. Com seus respectivos controles: a - controle de explante, b - controle de pré cultivo, c - controle de saturação, d - controle de vitrificação (N<sub>2</sub>L-). Foto: Daniela Oliveira. 2016.

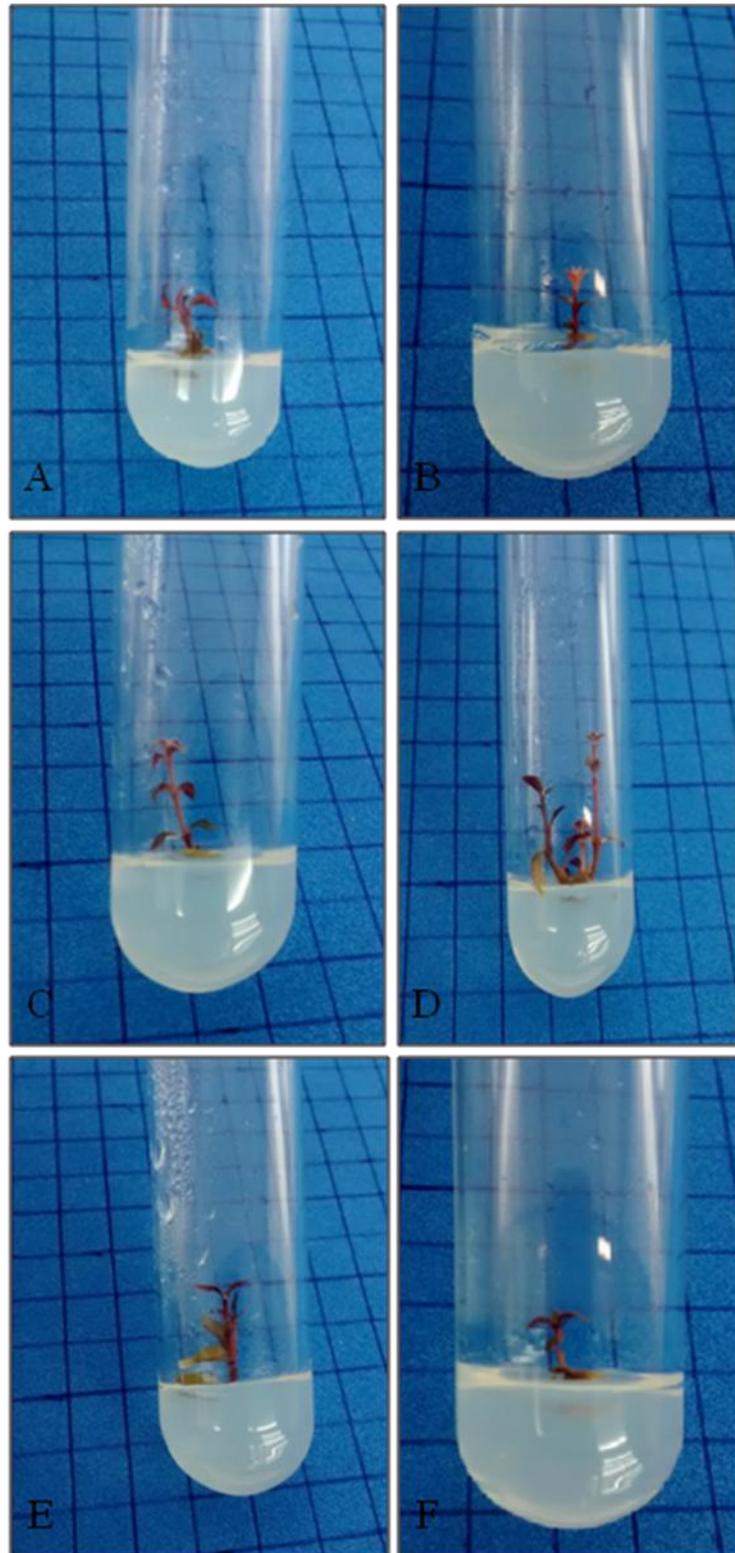


Figura 3.12 - Regeneração de explantes de *P. glomerata* (Spreng.) Pedersen após tratamento em solução de vitrificação PVS<sub>4</sub> e congelamento em nitrogênio líquido. A - PVS<sub>4</sub>, 25°C por 20 minutos; B - PVS<sub>4</sub>, 0°C por 20 minutos; C - PVS<sub>4</sub>, 25°C por 40 minutos; D - PVS<sub>4</sub>, 0°C por 40 minutos; E - PVS<sub>4</sub>, 25°C por 60 minutos; F - PVS<sub>4</sub>, 0°C por 60 minutos. Foto: Daniela Oliveira. 2016.

Segundo Panis *et al.* (2011), o tratamento com PVS<sub>2</sub> varia consideravelmente entre as espécies e quanto mais prolongado o tempo de exposição mais letal às células. Assim sendo, os melhores tempos de exposição às soluções de vitrificação foram de 40 min. para *Musa spp.* (PANIS *et al.*, 2005), 20 min. para *Rosa hybrida* L. (HALMAGYI e PINKER, 2006), 60 min para *Malus domestica* Borkh. (CONDELLO *et al.*, 2011), 30 min para *Byrsonima intermedia* A. Juss (SILVA *et al.*, 2013), 20 min. para *Rosa agrestis*, *R. canina* e *R. dumalis* e de 30 min. para *Rosa rubiginosa* (PAWLOWSKA e SZEWCZYK-TARANNEK, 2015).

Ao se utilizar a solução de vitrificação PVS<sub>4</sub> em AC de *P. glomerata* pode ter ocorrido uma desidratação excessiva às células, resultando na baixa porcentagem de retomada de crescimento observada nos explantes imersos em NL.

Barraco *et al.* (2011) observaram que a brotação de duas cultivares de cana de açúcar (H70-144 do Havaí, E CP68-1026 dos Estados Unidos) apresentaram valores relativamente altos de tolerância às soluções de vitrificação PVS<sub>2</sub> e PVS<sub>3</sub> por períodos de exposição de 20 e 40 min., com uma média de 70% de sobrevivências. Nos experimentos realizados com a PVS<sub>4</sub>, a regeneração dos explantes imersos em nitrogênio líquido foi baixa com o valor mínimo de 10% e o máximo de 32%.

Panis *et al.*, (2005) verificaram um aumento de regeneração de 42% para os ápices caulinares de banana de quatro grupos genômicos criopreservados adotando-se a técnica de gota vitrificação em comparação ao método de vitrificação tradicional anteriormente utilizado.

### **3.4.CONCLUSÕES**

Os testes de gota vitrificação realizados para a espécie *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen permitiram identificar as condições mais promissoras para a conservação de seu germoplasma: desidratação em solução de vitrificação PVS<sub>3</sub>, com tempo e temperatura de exposição à solução de 40 min e 0°C, respectivamente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BARRACO, G.; SYLVESTRE, I.; ENGELMANN, F. Comparing encapsulation-dehydration and droplet-vitrification for cryopreservation of sugarcane (*Saccharum* spp.) shoot tips. **Scientia Horticulturae**, v.130, p.320-324, 2011a. DOI: 10.1016/j.scienta.2011.07.003.

CARVALHO, J.M.F.; VIDAL, M.S. Crioconservação no Melhoramento Vegetal. Campina Grande, 2003. 22p.

CONDELLO, E.; CABONI, E.; ANDRE, E.; PIETTE, B.; DRUART, R.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Cryopreservation of apple in vitro axillary buds using droplet-vitrification. **CryoLetters**, v.32, p.175-85, 2011.

ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. **Plant Genetic Resources Newsletter** 112: 9-18. (1997).

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro e Developmental Biology**, v. 47, p. 5-16, 2011.

FIGUEIREDO, L. S. *et al.* Comportamento de acessos de *Pfaffia glomerata* nas condições de campos de Goytacazes - RJ. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, p. 67-72, 2004.

FULLER B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. **Cryo-Letters** 2004; 25:375-388.

HALMAGYI, A.; PINKER, I. Plant regeneration from Rosa shoot tips cryopreserved by a combined droplet-vitrification method. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.84, p.145-153, 2006. DOI: 10.1007/s11240-005-9012-z.

KIM S.H., KU S.Y., SUNG K.C., KANG M.J., KIM S.A., KIM H.S., OH S.K., JEE B.C., SUH C.S., CHOI Y.M., KIM J.G. & MOON S.Y. Simplified EM grid vitrification is a convenient and efficient method for mouse mature oocyte cryopreservation. **Yonsei Med J.** 47(3):339-404. 2006

LEUNUFNA, S.; KELLER, E. R. J. Investigating a new cryopreservation protocol for yams (*Dioscorea* spp.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, n. 12, p. 1159-1166, Aug. 2003.

MAZUR, P. **Freezing of living cells: mechanisms and implications.** **Cell Physiology v. 16 - American Journal of Physiology v. 247**, p. 125-142, 1984.

MERCIER, H.; VIEIRA, C.C.J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Tissue culture and plant propagation of *Gomphrena officinalis* - a brazilian medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 28: 249-254. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** V. 28, Issue 3, p. 249-254. 1992.

MONTANARI, I.Jr.; MAGALHÃES, P.M.; QUEIROGA, C.L. Influence of plantation density and cultivation cycle on root productivity and tenors of  $\beta$ -ecdysone in *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **Acta Horticulturae, Wageningen**, v.3, n. 502, p.125-129, 1999.

MURASHIGE, T.;SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15. 1962.

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

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

PANIS, B. Cryopreservation of musa germplasm. 2<sup>nd</sup> ed. Montpellier: Bioersity International, 2009. 48 p. (**INIBAP Technical Guideline**, 9).

PANIS, B.; PIETTE, B.; ANDRÉ, E.; van den HOUWE, I.; SWENNEM, R. Droplet-vitrification: the first generic cryopreservation protocol for organized plant tissues. **Acta Horticulturae**, v. 908, p.157-164, 2011.

REED, B.M. Plant cryopreservation: a practical guide. **Springer Science**. 513p. 2008.

SILVA JÚNIOR, A.; OSAIDA, C. C. Ginseng-brasileiro – novo estímulo para o campo e para o corpo. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.18, n.2, p.41-44, 2005.

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. **CryoLetters** 34 (4), p. 338-348. Jul/Aug 2013.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. **Plantarum**, Nova Odessa. 2005.

SURANTHRAN, P.; GANTAIT, S.; SINNIHAH, U.R.; SUBRAMANIAM, S.; ALWEE, S.S.R.S.; ROOWI, S.H. Effect of loading and vitrification solutions on survival of cryopreserved oil palm polyembryoids. **Plant Growth Regulation**, v.66, p.101-109, 2012. DOI: 10.1007/s10725-011-9633-7.

TOWILL, L. E.; BONNART, R. Cracking in a vitrification solution during cooling or warming does not affect growth of cryopreserved mint shoot tips. **CryoLetters**, Cambridge, v. 24, n 6, p. 342-346, Nov/Dec. 2003.

VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; MILANEZE-GUTIERREZ, M.A.; RIBEIRO, P.G.F.; MARQUES, L.C. Caracterização farmacognóstica comparativa da *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Herbanthe paniculata* Martius - Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, n.2, p.7-19, 2004.

ZIMMER, A.R.; BRUXEL, F.; BASSANI, V.L.; GOSMANN, G. HPLC method for the determination of ecdysterone in extractive solution from *Pfaffia glomerata*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.40, p.450-453, 2006.

## CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

### CONCLUSÕES GERAIS

Dentre os métodos utilizados para a criopreservação de ápices caulinares de *P. glomerata*, vitrificação e gota vitrificação, o método mais eficiente, com maiores percentuais de regeneração dos AC, é o método de gota vitrificação adotando-se o tempo de 40 minutos de exposição do explante à solução crioprotetora PVS<sub>3</sub> na temperatura de 0°C.

Os métodos de descontaminação e introdução *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen foram eficientes. Para maior porcentagem de regeneração de explantes de *P. glomerata* o mais indicado é a combinação de hipoclorito de sódio, detergente Tween juntamente com o antibiótico estreptomicina.

### SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os trabalhos realizados nessa tese para a criopreservação de *Pfaffia glomerata* foram promissores, com altas taxas de sobrevivência dos ápices caulinares com o uso da técnica de gota vitrificação. Para um melhor aprimoramento dessa metodologia para a conservação do germoplasma de *P. glomerata* sugere-se fazer ajustes na solução de criopreservação PVS<sub>3</sub> bem como no tempo de exposição dos explantes a essa solução.

Realizar trabalhos complementares de acompanhamento das plântulas criopreservadas até o plantio e estabelecimento em campo experimental de plântulas criopreservadas de *Pfaffia glomerata*.