

José Nacarato Neto

**Efeito do quefirano sobre a viabilidade celular e atividade de enzimas
antioxidantes em calos *Handroanthus impetiginosus* (Bignoniaceae)**

José Nacarato Neto

Efeito do quefirano sobre a viabilidade celular e atividade de enzimas antioxidantes em calos *Handroanthus impetiginosus* (Bignoniaceae)

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre, área de Concentração: Tecnologias ambientais aplicadas.

Orientador: Dr. Plínio Rodrigues dos Santos Filho

Coorientador: Dr. Breno Régis Santos

**Alfenas-MG
2018**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG
Programa de Pós-graduação – Ciências Ambientais
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714. Alfenas - MG CEP 37130-000
Fone: (35) 3701-9685 (Coordenação) / (35) 3701-9262 (Secretaria)
<http://www.unifal-mg.edu.br/ppgca/>



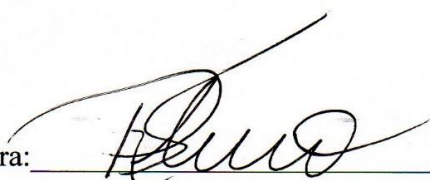
JOSÉ NACARATO NETO

**“Efeito do quefirano sobre a viabilidade celular e atividade de enzimas antioxidantes em calos
Handroanthus impetiginosus”**

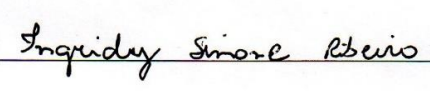
A Banca julgadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Ciências Ambientais.

Aprovado em: 06 de abril de 2018.

Prof. Dr. Plinio Rodrigues dos Santos Filho
Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Ingridy Simone Ribeiro
Instituição: IFSULDEMINAS

Assinatura: 

Prof. Dr. Thiago Corrêa de Souza
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus: minha luz e meu guia para o bem.

Agradeço a minha mãe Ioni Neves Marcelini que sempre esteve do meu lado, tanto nos momentos bons e como nos momentos difíceis de minha vida, me oferecendo todos os conselhos e apoio necessário para seguir em frente. Sem ela nada disso seria possível, gratidão pelo amor verdadeiro.

Agradeço a minha namorada, Amanda Maria Bento Silva, que sempre me incentivou e nunca me deixou desistir dos meus sonhos, me auxiliando a todo o momento.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da UNIFAL-MG pela infraestrutura e oportunidade de me tornar mestre.

Agradeço ao meu orientador Plínio Rodrigues dos Santos Filho por me instruir até aqui e ter aceitado me orientar nessa linha de pesquisa.

Agradeço ao professor Dr. Jose Mauricio Schneedorf Ferreira da Silva, pelo fornecimento do quefir em grãos e por todos os ensinamentos ao longo da pesquisa.

Agradeço aos amigos Gustavo Nogueira, Marco Aurélio Boaventura, Marco Aurélio Leite, Elba Dias e Leila Mcleod que me auxiliaram muito nas análises experimentais quando precisei.

Agradeço a todos meus amigos e familiares, que estiveram do meu lado nessa caminhada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- BRASIL (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Não existe um caminho para a felicidade. A felicidade é o caminho.”

Thich Nhat Han

RESUMO

Handroanthus impetiginosus, popularmente conhecida como Ipê-roxo é nativa da América do sul, ocorrendo no Brasil desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul. Essa planta apresenta considerável potencial medicinal e madeireiro, sendo alvo de processos extrativistas. Assim, a cultura de tecidos de plantas constitui uma ferramenta biotecnológica interessante para o estudo e conservação dessa espécie. Estratégias biotecnológicas tem amplo potencial para reprodução e conservação de espécies nativas. Entre essas alternativas encontra-se a cultura de tecidos, em especial a embriogênese somática. A formação de calos embriogênicos pode ser resultado de vários fatores, como a combinação hormonal ou até a adição de substratos e nutrientes, dessa forma adicionou-se o quefirano no subcultivo dos calos de ipê-roxo. O quefir é uma suspensão de microrganismos simbiotes formados por um grande número de cepas de bactérias e de leveduras, ambos encapsulados em uma matriz de polissacarídeos secretados pelas primeiras, esse exopolissacarídeo é denominado quefirano ou KFG (fator de crescimento de quefir). O presente estudo teve por objetivo avaliar a ação da aplicação exógena de quefirano sobre a viabilidade celular e o sistema antioxidante enzimático de calos de Ipê Roxo. Segmentos caulinares internodais foram inoculados em meio MS contendo 1,0 μM do regulador 2,4D, 6 g/l de ágar e 30 g/l de sacarose e 10 mg L⁻¹ de ácido cítrico. Após 60 dias de cultivo os calos foram subcultivados na presença de Quefirano em suspensão no meio de cultura em diferentes concentrações (Controle: 0; T1: 50; T2: 100 e T3: 200 mg L⁻¹). O grupo controle foi subcultivado nas mesmas condições da indução dos calos. Foi analisada a viabilidade dos calos bem como a atividade das enzimas do sistema antioxidante. Os resultados obtidos mostraram que a viabilidade celular dos calos foi maior no cultivo de 35 dias, assim como o potencial embriogênico. Na análise citoquímica, o método de dupla coloração se mostrou eficiente, sendo que o corante Carmim acético reagiu mais intensamente com os tratamentos T2 e T3, nos calos da primeira coleta com 35 dias de cultivo. Em relação à atividade enzimática houve um aumento de atividade da superóxido desmutase (SOD) e da ascorbato peroxidase (APX) em consonância com as maiores concentrações de quefirano em calos com 70 dias, isso evidencia a ativação de respostas de defesa na planta e podem ser considerados marcadores biológicos para investigar a eficiência de elicitores como o quefirano.

Palavras Chave: Plantas lenhosas, Polissacarídeos, calogênese, quefir.

ABSTRACT

Handroanthus impetiginosus, popularly known as Ipê-purple is native to South America, occurring in Brazil from the Amazon to Rio Grande do Sul. This plant presents considerable medicinal and logging potential, being the target of extractive processes. Thus, tissue culture of plants constitutes an interesting biotechnological tool for the study and conservation of this species. Biotechnology strategies have broad potential for breeding and conservation of native species. Among these alternatives is tissue culture, especially somatic embryogenesis. The formation of embryogenic calli may be the result of several factors, such as the hormonal combination or until the addition of substrates and nutrients, in this way the kefir was added in the subculture of the calli-purple calli. kefir is a suspension of symbiotic microorganisms formed by a large number of strains of bacteria and yeasts, both encapsulated in a matrix of polysaccharides secreted by the former, this exopolysaccharide is termed kefiran or KFG (Kefir growth factor). The present study had as objective to evaluate the action of the exogenous application of quefirano on the cell viability and the antioxidant enzymatic system of calluses of Ipê Roxo. Internodal stem segments were inoculated in MS medium containing 1.0 μM of the 2,4 D regulator, 6 g / l agar and 30 g / l sucrose and 10 mg L⁻¹ citric acid. After 60 days of culture the calli were subcultured in the presence of Quefirano in suspension in the culture medium at different concentrations (Control: 0, T1: 50, T2: 100 and T3: 200 mg / L). The control group was subcultured under the same conditions of callus induction. The viability of the callus as well as the activity of the enzymes of the antioxidant system were analyzed. The results showed that the cellular viability of the calli was greater in the 35 day culture, as well as the embryogenic potential. In the cytochemical analysis, the double staining method was efficient, and the acetic Carmine dye reacted more intensely with the treatments T2 and T3, in the calluses of the first collection with 35 days of culture. In relation to the enzymatic activity, there was an increase in the activity of superoxide desmutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX) in consonance with the higher concentrations of chyphir in calluses with 70 days, this evidences the activation of defense responses in the plant and can be considered biotic markers to investigate the efficiency of elicitors such as quefirano.

Keywords: Woody plants, Polysaccharides, calogenesis, kefir.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1 Ipê-Roxo (<i>Handroanthus impetiginosus</i>) e sua importância	10
2.2 Culturas de tecidos e indução de calos	11
2.3 Embriogênese somática e suas aplicações	12
2.4 Quefir e seus efeitos biológicos	13
2.5 Enzimas do sistema antioxidante	15
3 JUSTIFICATIVA	15
4 OBJETIVO	16
4.1 Objetivo gerais	16
4.2 Objetivos específicos	15
5 MATERIAL E MÉTODOS	17
5.1 Material vegetal e estabelecimento de plantas	17
5.2 Isolamento do polissacarídeo (quefirano)	17
5.3 Indução dos calos	17
5.4 Subcultivo dos calos na presença do quefir	17
5.5 Determinação da viabilidade celular	18
5.5.1 Método citoquímico	18
5.5.2 Redução do cloreto de 2, 3,5 Trifeniltetrazólio (TTC)	18
5.6 Determinação da atividade das enzimas do sistema antioxidante	19
5.7 Análise estatística	20
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
6.1 Viabilidade celular por redução de TTC	20
6.2 Método citoquímico por dupla coloração	21
6.3 Atividade das enzimas do sistema antioxidante	24
7 CONCLUSÕES	26
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Grãos de quefir "in natura"	13
FIGURA 2- Viabilidade celular por redução de 2,3,4 Trifeniltetrazólio	18
FIGURA 3- Porcentagem das áreas coradas com carmim acético e Azul de evans em calos de Ipê roxo	19
FIGURA 4- Comparação entre os tratamentos de quefirano e grupo controle em calos com 35 dias de subcultivo.....	20
FIGURA 5- Comparação entre os tratamentos de quefirano e grupo controle em calos com 70 dias de subcultivo.....	21
FIGURA 6- Atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) em calos com 35 e 70 dias de cultivo	22
FIGURA 7- Atividade da enzima CATALASE em calos com 35 e 70 dias de cultivo.	23
FIGURA 8- Atividade da enzima superóxido desmutase (SOD) em calos com 35 e 70 dias de cultivo.	24
FIGURA 9- Atividade da enzima guaiacol peroxidase (GPX) em calos com 35 e 70 dias de cultivo	25

1 INTRODUÇÃO

Handroanthus impetiginosus, popularmente conhecida como Ipê-roxo é nativa da América do sul, ocorrendo no Brasil desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul. Essa planta apresenta considerável potencial medicinal, madeireiro e paisagístico. Por essa razão, tem sido alvo de processos extrativistas.

O desenvolvimento de metodologias de propagação vegetativa tem sido apontado como alternativa para produção de mudas de Ipê roxo, pela possibilidade de multiplicar fragmentos vegetais e se obter milhares de mudas geneticamente iguais à planta mãe e uniformização dos plantios. Teoricamente, quando um segmento de tecido vegetal assepticamente cultivado é transferido para um meio de cultura apropriado e mantido em condições adequadas, algumas células se dividem e após intensa proliferação dão origem a uma massa não diferenciada de células. A formação dessa massa, denominada calo, é uma etapa básica para o desenvolvimento de sistemas de propagação massiva de plantas por organogênese ou embriogênese somática.

O presente estudo analisou o efeito do Quefirano, um bioproduto carboidratado secretado por algumas bactérias presentes nos grãos de quefir e que permite o encapsulamento de suas cepas microbianas em uma matriz de polissacarídeos. Os grãos de quefir são massas gelatinosas medindo de 3 a 35 mm de diâmetro, possuem uma aparência semelhante à couve-flor, apresentando forma irregular e coloração amarelada ou esbranquiçada. Nesta estrutura, existe uma associação simbiótica de leveduras, bactérias ácido-láticas, bactérias ácido-acéticas, entre outros microrganismos, envoltas por uma matriz de polissacarídeos referidos como quefirano (OTLES e CAGINDI, 2003; IRGOYEN et al., 2005; WESCHENFELDER et al., 2009).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ipê-Roxo (*Handroanthus impetiginosus*) e sua importância

Handroanthus impetiginosus, conhecida vulgarmente como ipê-roxo, ipê-rosa-de-folha-larga, ipê-rosado, ipê-roxo-da-casca-lisa, ipeúna, ipê-de-minas e pau-d'arco é uma espécie caducifólia, da família Bignoniaceae, podendo atingir até 15 m de altura e 30 cm de diâmetro na altura do peito (DAP). Suas folhas são compostas, folioladas, folíolos coriáceos, pubescentes em ambas as faces e levemente serradas até o ápice (CARVALHO, 1994).

A espécie apresenta habitat característico de Floresta estacional semidecidual e decidual, sendo frequente no cerradão, cerrado, caatinga e mata seca (CARVALHO, 1994), com ocorrência desde o Piauí e Ceará, até Minas Gerais, Goiás e São Paulo (LORENZI, 2002). É classificada como secundária tardia a clímax (CARVALHO, 1994) e muito utilizada para recuperação de áreas degradadas (LORENZI, 2002). O tronco é reto, cilíndrico e, eventualmente, tortuoso. A casca externa é grisácea, levemente áspera, com sulcos longitudinais pouco profundos e fissuras horizontais curtas e irregulares, desprendendo-se em escamas retangulares e grossas. A casca interna é fibrosa, marrom-clara e levemente rosada. As folhas são opostas digitadas, apresentando pecíolo de até 11 cm de comprimento, geralmente com cinco folíolos, com margem inteira ou levemente serrada. Os folíolos apresentam mechas de pêlos na axila da nervura principal com as secundárias. As flores são grandes, rosadas a lilás, tubulares, vistosas, reunidas em panícula terminal. O fruto é silíquo cilíndrico estreito, deiscente, com numerosas sementes. As sementes são cordiformes, apresentam superfície lisa lustrosa de cor marrom-clara, com presença de asa membranácea nas duas extremidades de cor marrom clara transparente de até 3 cm de comprimento, sendo sua dispersão anemocórica (REITZ et al., 1988 e CARVALHO, 1994).

Uma das características silviculturais dessa espécie é o fato de ser heliófila, porém tolera sombreamento moderado na fase jovem, podendo ser plantada a pleno sol, principalmente nos solos férteis, em plantios mistos associada com espécies pioneiras, e em enriquecimento de capoeiras ou capoeirões ao ser plantado em linhas ou faixas. Além disso, apresenta desrama natural satisfatória, quando plantada em adensamento, mas na maioria dos casos necessita de poda, apresentando uma boa cicatrização.

A partir de uma perspectiva etnobotânica, verifica-se uma importante tradição na aplicação medicinal do Ipê-roxo na América do Sul. Uma das propriedades biológicas dessa planta é a atividade antitumoral. A espécie *Handroanthus impetiginosus* tem mostrado

atividades contra diferentes tumores, tais como, câncer de próstata (LI et al., 1995) e tumor mamário humano (WUERZBERGER et al., 1998). Do ponto de vista paisagístico e silvicultural, o ipê roxo é valorizado por sua madeira de qualidade usada para diversos fins, tais como para confecção de móveis, portais, postes, tacos, na construção civil como vigas e na construção naval.

Essas aplicações tornaram essa espécie alvo de exploração para fins medicinais e madeireiros tornando-a ameaçada de extinção (SCHULZE et al., 2008).

2.2 Culturas de tecidos e indução de calos

A cultura de tecidos consiste no cultivo *in vitro* de células, tecidos ou órgãos vegetais em condições controladas (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). Essa técnica tem sido considerada uma metodologia quase indispensável no que se refere à propagação de espécies de interesse agrícola, farmacêutico, paisagístico e silvicultural. Dessa forma, considera-se que para o sucesso do cultivo *in vitro* são necessários conhecimentos de biologia vegetal no que tange aos aspectos anatômicos, fisiológicos, bioquímicos e genéticos (KERBAUY, 1997; ALMEIDA, 2012).

O cultivo *in vitro* de plantas é baseado na totipotencialidade das células vegetais (VOGEL 2005), o que permite que a célula sofra desdiferenciação, ou seja, perca as características diferenciadas e reinicie a divisão celular quando removidas da planta e colocadas em meio de cultura específico. Por meio dessa técnica é possível a preservação de germoplasma, produção de metabólitos secundários, hibridação e obtenção de plantas livres de viroses. Desde o princípio, experimentos com a utilização dos mais variados tipos de explantes e distintas alterações nos meios de cultura para utilização *in vitro* têm sido testadas na tentativa de desvendar os complexos processos moleculares, fisiológicos e bioquímicos que determinam a competência morfogênica em células vegetais (MORDHORST et al., 1997).

O processo de formação de calo, também conhecido como calogênese, é uma das etapas para o desenvolvimento de sistemas de propagação vegetativa em massa. Teoricamente, quando um segmento de tecido vegetal é transferido para um meio de cultura apropriado e mantido em condições adequadas, algumas células se desdiferenciam e após intensa proliferação dão origem a uma massa de células. A partir dessa massa de células é possível estabelecer sistemas de propagação massiva de plantas por organogênese ou embriogênese somática indireta. Em tese, calogênese é uma cultura de massa celular, com crescimento desordenado e certo grau de diferenciação (TORRES et al., 2000).

As células dos calos também podem ser úteis quando se deseja realizar manipulações genéticas, como poliploidizações, transformações ou hibridizações, bem como obtenção de metabólitos secundários (VENTURIERI; VENTURIERI, 2004).

O desenvolvimento de metodologias de propagação vegetativa em cultura de tecidos tem sido apontado como alternativa potencial para produção de mudas de espécies nativas, pela possibilidade de multiplicar fragmentos vegetais e se obter milhares de mudas geneticamente iguais à planta mãe e padronização dos plantios (DE SOUZA REIS et al., 2008).

Calos se desenvolvem como resposta a uma lesão química ou física a partir de alterações no balanço hormonal (GEORGE, 1996). Para sua indução pode-se utilizar a injúria física dos tecidos dos explantes ou, mais comumente, a suplementação do meio de cultura com reguladores de crescimento. Estes agentes agem sobre a expressão gênica, fazendo com que, a partir de células de tecidos organizados, se forme uma massa desorganizada de células, cujo crescimento é geralmente rápido e bastante irregular (DE SOUZA REIS et al., 2008). Inúmeros trabalhos vêm sendo desenvolvidos envolvendo calogênese, tanto em estudos sobre a produção de metabólitos secundários em plantas medicinais, como carqueja (*Baccharia trimera* Less D.C.) (SILVA, 2001) e murici pequeno *Bysonima intermédia* A (. Juss.) (NOGUEIRA, 2003) quanto com embriogênese somática (PEREIRA 2005; SATISH et al., 2016; KHILWANI et al., 2017).

2.3 Embriogênese somática e suas aplicações

A embriogênese somática consiste no processo de regeneração de plantas a partir do cultivo *in vitro*, em que células somáticas ou haplóides desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, formando estruturas semelhantes a embriões zigóticos, sem fusão de gametas (BISPO et al., 2007). Segundo Ammirato (1983), a embriogênese somática é um processo análogo à embriogênese zigótica em que, uma única célula ou um grupo de células somáticas são precursores de embriões somáticos. Embriões somáticos podem se diferenciar diretamente do explante, sem ocorrência de uma fase de calo ou indiretamente após a fase de formação de calo (ARNOLD et al., 2002). A embriogênese somática destaca-se entre os vários sistemas de cultivo *in vitro* por ser eficiente na propagação clonal de plantas férteis.

Diferentes modificações têm sido empregadas no meio de cultura para indução da embriogênese somática, pois esse processo é altamente dependente de sua composição, principalmente, das fontes de carboidratos e reguladores vegetais. Dos componentes do meio de cultura, os carboidratos, além de proporcionarem uma fonte de energia ao explante, são

fundamentais para indução da embriogênese somática e cultivo dos embriões, sendo a sacarose o carboidrato mais comumente utilizado (CASTRO et al., 2010).

Embora a embriogênese somática seja apontada como uma metodologia segura de propagação *in vitro*, existe uma possibilidade de variação somaclonal sendo demonstrada (JAIN, 2001). As variações cromossômicas numéricas, tais como aneuploidias e poliploidias, são as alterações mais comuns e geralmente estão associadas à idade da cultura e a estresse por reguladores de crescimento ou a ambos (CASSELS & CURRY, 2001).

Além das características morfológicas, as células embriogênicas reagem intensamente ao corante carmim acético. Em estudos citoquímicos, o carmim acético é usado para detectar glicoproteínas, cromatina e DNA (GRUPTA E DURZAN, 1987), macromoléculas encontradas nas células embriogênicas. Dessa forma, avaliações citoquímicas são úteis para caracterizar a ontogenia dos embriões, verificar a origem dos mesmos e as possíveis causas da ausência de conversão de embriões em plântulas.

2.4 Quefir e seus efeitos biológicos

O quefir é uma suspensão de microrganismos simbioses formados por um grande número de cepas de bactérias (predominantemente ácido-lácticas - BAL) e de leveduras, ambos encapsulados em uma matriz de polissacarídeos secretados pelas primeiras. Historicamente, o quefir é originário das montanhas do Cáucaso, havendo citações místicas de que seria "um presente do profeta Maomé ao seu povo, para a cura de todos os males". Em eslavo, "Kephir" significa "bem-estar" (DINIZ 2003).

O quefir produz uma bebida fermentada utilizada no ocidente por suas propriedades organolépticas e uso tradicional na medicina popular. Seu produto fermentado resulta em uma solução ácida contendo compostos aromáticos, gás carbônico e etanol. Macroscopicamente o quefir se apresenta em grãos gelatinosos, medindo de 3 a 20 mm de tamanho e com propriedades organolépticas definidas para cada combinação microbiológica (DINIZ 2003).

Nos grãos de quefir é encontrada uma diversidade microbiológica elevada, que inclui espécies de leveduras, bactérias do ácido láctico, bactérias do ácido acético e fungos. A composição da população pode diferir, dependendo da origem dos grãos ou dos diferentes métodos de cultivo. Alguns microrganismos estão sempre presentes no simbiótico, mas outros nem sempre são encontrados, dependendo do método de cultura e substrato utilizado. Em culturas lácteas encontra-se um polissacarídeo conhecido como quefirano, ou como fator de crescimento de quefir - KGF, que constitui um bioproduto carboidratado secretado por algumas

bactérias presentes nos grãos de quefir e que permite o encapsulamento de suas cepas microbianas em uma matriz de polissacarídeos. É um exopolissacarídeo parcialmente solúvel em água, composto de unidades repetitivas de monossacarídeos (galactose e glicose) (MICHELI et al. 1999).

Dornelles (2006) estudando o processo fermentativo usando grãos de quefir e caldo de cana-de-açúcar como substrato, obteve resultados que indicam a viabilidade do uso dos mesmos, na produção de etanol. No que diz respeito ao controle de doenças de plantas, Mesquini et al. (2007) constataram o potencial de grãos de quefir autoclavados sequencialmente, em induzir a produção de fitoalexinas em soja e de inibir a germinação de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. Igualmente, Campos (2008) demonstrou o efeito positivo do tratamento de frutos de morango com grãos de quefir na manutenção de características físico-químicas e microbiológicas na conservação em pós-colheita dos frutos.



Figura 1: Grãos de quefir “in natura” antes do processo de obtenção do polissacarídeo (quefirano).

Nesse sentido, o quefir pode ser estudado como um potencial elicitor para a propagação vegetativa. O elicitor pode ser uma molécula presente em um organismo que têm como função gerar respostas de defesa. Estes podem ser moléculas de fungos, bactérias e vírus (ANDREU et al., 1998). Alguns estudos comprovam a indução de respostas de defesa em plantas por elicitores. Plantas de pepino inoculadas com *Colletotrichum lagenarium* tiveram acúmulo de compostos fenólicos (STEIN et al., 1993). Em plantas de maracujá houve a redução do número de lesões locais e infecção sistêmica causadas por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflora* quando tratadas com *S. cerevisiae* (PASCHOLATI, 1998).

2.5 Enzimas do Sistema Antioxidante

As enzimas e os metabólitos do sistema antioxidativo são bastante sensíveis às condições de estresse abiótico servindo como sinalizadoras do estresse.

A superóxido dismutase (SOD) é uma das primeiras enzimas com atividade antioxidante a ser ativada e é responsável por transformar o superóxido, que é uma espécie ativa de oxigênio, em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Após essa catálise, o peróxido de hidrogênio é transformado em água e hidrogênio pelas enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (GPX) (GILL e TUTEJA, 2010; JEBARA et al., 2005). Em plantas, a enzima catalase é encontrada, majoritariamente, nos peroxissomos, onde atua na remoção do H_2O_2 formado durante a fotorrespiração (Bowler et al., 1992). Essa enzima apresenta baixa atividade no citossol, na mitocôndria e nos cloroplastos (Mizuno et al., 1998). A APX catalisa a oxidação do ascorbato em monodesidroascorbato (MDHA), apresentando alta especificidade por ascorbato como substrato redutor e potencializam a redução de H_2O_2 em água (Jimenez et al., 2002). Já a enzima guaiacol peroxidase, como apresentado, por Foyer & Noctor (1998), participa da eliminação direta do H_2O_2 , sendo sua ação no citossol, vacúolo e parede celular.

3 JUSTIFICATIVA

A espécie *Handroanthus impetiginosus* tem despertado crescente interesse tanto pelo setor de pesquisa quanto industrial pela demanda por sua madeira, seu rápido crescimento e a carência tecnológica sobre a sua cultura. Contudo, pesquisadores ainda consideram o Ipê-Roxo uma planta semi-domesticada. Com a crescente compreensão da função ecológica das florestas para a sustentabilidade da vida no planeta e as possíveis consequências decorrentes da exploração indiscriminada, florestamentos e reflorestamentos encontram-se nas agendas de diversas nações. Neste contexto, encontram-se as técnicas de cultura de tecidos vegetais, as quais oferecem potencial para a rápida multiplicação de linhagens elite em larga escala. Em árvores, estas tecnologias são essenciais frente aos longos períodos necessários à multiplicação e à maturação das plantas. O uso da Quefirano se justifica por ter propriedades organolépticas e existir indícios na literatura de que esse conjunto de polissacarídeos auxilia na manutenção de características físico-químicas e microbiológicas para a conservação e desenvolvimento de células vegetais.

4 OBJETIVO

4.1 Objetivo geral

O presente estudo teve por objetivo avaliar a ação da aplicação exógena de Quefirano sobre a viabilidade celular e o sistema antioxidante enzimático de calos de Ipê Roxo.

4.2 Objetivos específicos

- Obtenção do quefirano.
- Avaliar do potencial embriogênico dos calos de ipê-roxo.
- Avaliar a viabilidade celular dos calos de ipê-roxo.
- Verificar a atividade das enzimas do sistema antioxidante: APX, Catalase, GPX e SOD.
- Analisar o potencial embriogênico dos calos de ipê-roxo.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material Vegetal e estabelecimento de plantas

Sementes de Ipê-roxo foram coletadas na região de Alfenas-MG e armazenadas à temperatura ambiente em local livre de umidade. No momento do uso, as sementes foram desinfestadas com etanol 70°GL por 1 minuto e hipoclorito de sódio por 5 minutos seguido de tríplice lavagem em água destilada e autoclavada. As sementes foram inoculadas em meio WPM (LOYD; MCCOWN, 1980) para estabelecimento de plantas matrizes *in vitro*. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas e irradiância de $36\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

5.2 Isolamento do polissacarídeo (quefirano)

O isolamento da fração rica em carboidrato do quefir cultivado em meio aquoso foi feito de acordo com metodologia proposta por Micheli et al. (1999), com algumas alterações, depois de obtido o crescimento exponencial das culturas entre 7 e 15 dias. Os grãos de quefir foram colocados em um béquer contendo água destilada fervente, na proporção de 1:4, mantido em agitação e fervura durante 1 h. Após esse período, a mistura foi resfriada e centrifugada a 12000 g por 20 min. O precipitado foi então descartado, misturando-se o sobrenadante em igual volume de etanol 93% gelado. Após esse tratamento, o produto foi mantido sob 4°C por 15 h (overnight), sucedendo-se a centrifugação por 20 min a 12000 g. Após a centrifugação descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi colocado em estufa à temperatura de 50°C por 24 h.

5.3 Indução dos calos

Segmentos internodais de 1 cm provenientes das plantas matrizes foram inoculados em tubos contendo 20 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com $30\ \text{g}\ \text{L}^{-1}$ de sacarose, $10\ \text{mg}\ \text{L}^{-1}$ de ácido cítrico, $6\ \text{g}\ \text{L}^{-1}$ de ágar e $1\ \mu\text{mol/L}$ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D). Os tubos foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas e irradiância de $36\ \mu\text{mol}\ \text{m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$.

5.4 Subcultivo dos calos na presença do Quefir

Após 75 dias de cultivo em sala de crescimento os calos foram subcultivados na presença de quefirano nas diferentes concentrações (T1: 50 mg L⁻¹; T2: 100 mg L⁻¹ e T3: 200 mg L⁻¹) em frascos contendo 40 ml de meio MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de Ágar e 1 µmol/L de ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4 D). O grupo controle foi subcultivado nas mesmas condições da indução dos calos. O quefirano foi adicionado, em suspensão, ao meio de cultura MS antes da autoclavagem. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura de 25±1°C, fotoperíodo de 12 horas e irradiância de 36 µmol m⁻² s⁻¹.

5.5 Determinação da viabilidade celular

5.5.1 Método citoquímico

Amostras dos calos (50 mg) foram coletadas e espalhadas em lâminas de vidro com uma leve maceração. Em seguida, as lâminas foram adicionadas três gotas do corante Azul de Evans 0,1%, o qual permaneceu em reação por três minutos. Após esse período, foi retirado o excesso de corante e adicionado três gotas de Carmim acético 2%, o qual permaneceu em reação pelo mesmo tempo (VALENTE 2007). Por fim o excesso de corante foi retirado, a massa celular distribuída sobre a superfície da lâmina e analisadas em microscópio óptico com câmera digital acoplada na objetiva de 5x, zoom operation, resolução de 1.6x e flash ausente. Registraram-se cinco campos distintos de melhor resolução em cada lâmina e as imagens digitalizadas foram avaliadas através da porcentagem de área corada medida através de software AxioVision SE64 Rel.4.8. A calibragem foi feita por meio da digitalização de lâmina micrometrada fornecida pelo fabricante do equipamento utilizado no mesmo aumento das fotografias de acordo com Pereira et al. (2008).

5.5.2 Redução do cloreto de 2,3,5 Trifeniltetrazólio (TTC)

Amostras dos calos (50mg) foram incubadas por 15 horas a 30°C no escuro em tubos falcon contendo 5 ml de TTC 0,5% preparado em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0. Após esse período as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 4.000 rpm e o sobrenadante descartado. Acrescentaram-se 3 ml de etanol 94% aos tubos e foram aquecidos a 80°C por 5

min sob agitação suave. Centrifugou-se o material a 4000 rpm por 1 minuto e a absorbância foi medida a 487 nm em espectrofotômetro de acordo com Verleysen et al. (2004).

5.5 Determinação da atividade das enzimas do sistema antioxidante

Amostras dos calos (300mg) com 35 e 70 dias de cultivo foram homogeneizadas em quatro volumes de tampão fosfato 50 mM pH 7,5 contendo 1 mM de EDTA, 1 mM de PMSF e 5% de polivinilpirrolidona (PVPP) em banho de gelo. O homogeneizado foi centrifugado a 12000 g por 30 min e o sobrenadante usado para determinação da atividade enzimática. O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (1976) usando Albumina Soro Bovina como padrão e a atividade enzimática de acordo com García Limones et al., (2002).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada por sua capacidade de inibir a redução fotoquímica do nitro blue tetrazolium. A mistura de reação foi formada por tampão fosfato 50 mM pH 7,8, 0,1 mM de EDTA, 13 mM de metionina, 75 μ M de NBT, 2 μ M de riboflavina e diferentes volumes do extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição de riboflavina e a absorbância determinada após 12 minutos de incubação a temperatura ambiente sob luz contínua. Uma unidade de SOD foi definida pela quantidade de enzima que inibe 50% da taxa de redução do NBT.

A atividade do Guaiacol peroxidase (GPX) foi determinada através do acompanhamento da mudança de absorbância a 470 nm causada pela redução do guaiacol ($\epsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A mistura de reação foi formada por tampão fosfato 100 mM pH 6,5, 15 mM de Guaiacol, 0,05% (v/v) de H_2O_2 e diferentes concentrações do extrato enzimático.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada pelo consumo de H_2O_2 acompanhado pela queda da absorbância a 240 nm. A mistura de reação foi formada por tampão fosfato 50 mM pH 7,0, 20 mM de H_2O_2 e diferentes volumes do extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição do H_2O_2 ($\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de CAT foi definido pela quantidade de enzima necessária para decompor 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$ de H_2O_2 .

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi determinada pela diminuição da absorbância do ascorbato ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 290 nm. A mistura de reação foi formada por tampão fosfato 50 mM pH 7,0, ascorbato de sódio 0,25 mM, H_2O_2 5 mM e diferentes volumes do extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição do H_2O_2 . Uma unidade de APX foi definida pela quantidade de enzima que oxida 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$ de ascorbato.

5.8 Análise estatística

Os experimentos de cultura de tecidos foram plotados em delineamento inteiramente casualizado com quinze repetições por tratamento, sendo cada repetição formada por um frasco contendo três calos. O método citoquímico foi realizado com cinco calos distintos por tratamento, sendo que de cada calo produziu-se uma repetição de três lâminas. A análise de viabilidade por TTC foi realizada nos mesmos moldes experimentais da dupla coloração. A atividade das enzimas do sistema antioxidante foi obtida a partir de 5 repetições por tratamento, em um total de 20. Os dados obtidos após 35 e 70 dias de cultivo foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância no software Sisvar.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Viabilidade celular por redução de TTC

A análise da viabilidade celular foi realizada em calos coletados após 35 e 70 dias de cultivo nas condições pré-determinadas em diferentes concentrações de quefirano e no grupo controle. Os resultados estão apresentados na figura 2, onde os dados são comparados entre os tratamentos em cada coleta e em relação ao tempo de cultivo dos calos.

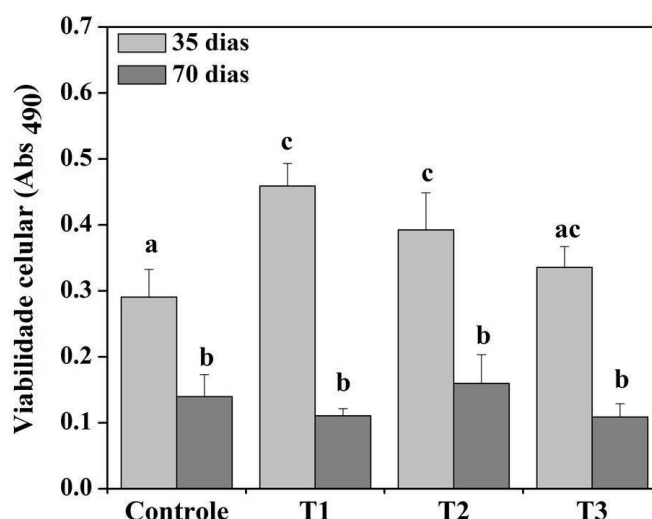


Figura 2: Viabilidade celular por redução de 2, 3,4 Trifeniltetrazólio nas coletas com 35 e 70 dias de subcultivo. Letras iguais indicam que os dados não diferem entre si de acordo como o teste de Tukey a 5% de significância. (A: controle; B: 50 mg L⁻¹; C: 100 mg L⁻¹ e D: 200 mg L⁻¹).

Aos 35 dias de cultivo, houve diferença significativa entre os tratamentos. A viabilidade celular foi maior em T1 e T2 (50 mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹) em relação ao grupo controle. Já o T3 foi estatisticamente igual aos outros tratamentos e o controle aos 35 dias. Contrariamente, após 70 dias de cultivo, não houve diferença estatística entre os tratamentos e nem em relação ao grupo controle (Figura 2). Na comparação entre as duas coletas, é perceptível uma queda significativa da viabilidade celular nos calos com 70 dias em relação aos de 35 dias. Isso corrobora com a hipótese de que quanto maior o tempo de cultivo, maior o desgaste das células e menor o potencial nutritivo do meio de cultura e do regulador de crescimento empregado (2,4 D).

O teste de tetrazólio baseia-se na atividade de enzimas desidrogenases (MOORE, 1973), que catalizam as reações respiratórias nas mitocôndrias, durante a glicólise e o ciclo de Krebs. Estas enzimas reduzem o TTC nos tecidos vivos. Quando os calos são imersos na solução incolor de TTC, este é difundido através dos tecidos, acontecendo nas células vivas o processo de redução que origina um composto vermelho, estável, conhecido por trifetilformazan (FRANÇA NETO et al., 1998; VERLEYSSEN et al., 2004).

A utilização do teste de TTC como medida de viabilidade tem sido reportada por vários autores. Mikula et al. (2006) aplicaram o teste de TTC para analisar a viabilidade de células embriogênicas criopreservadas de várias espécies vegetais. Lyngved et al. (2008) em estudo com massas pró-embriogênicas também fizeram o uso de TTC. Munhoz et al. (2008) testaram diversos corantes para viabilidade polínica de *Cariaca papaya* e concluiu que o TTC foi o único método que obteve resultados semelhantes à estimativa da viabilidade polínica em experimentos *in vitro*.

6.2 Método citoquímico por dupla coloração

Os calos embriogênicos são compostos, em grande parte, por células meristemáticas com dimensões pequenas e citoplasma denso (STEINER et al., 2005; GEORGE et al., 2008). Segundo Steiner et al. (2005), a utilização dos corantes Carmim acético e Azul de Evans possibilita a diferenciação de culturas celulares embriogênicas. Foi observado que o corante Carmim acético reagiu mais intensamente com os tratamentos T2 (100 mg L⁻¹ de quefirano) e T3 (200 mg L⁻¹ de quefirano), nos calos da primeira coleta com 35 dias de cultivo (figura 3).

De acordo com Steiner et al. (2005), células com potencial embriogênico são coradas em vermelho pelo Carmim acético e células não-embriogênicas são coradas pelo Azul de Evans. Os dados nos mostram que os tratamentos com maiores quantidades de quefirano presente no meio de cultura apresentaram um maior potencial embriogênico em relação ao controle e ao T1 (50 mg L⁻¹ de quefirano). Santos (2010) também observou em seus estudos com pinhão-manso (*Jatropha curcas L.*), o potencial embriogênico em calos cultivados em meio MS com 1 mg L⁻¹ de 2,4-D através do método de dupla coloração Carmim acético/Azul de Evans.

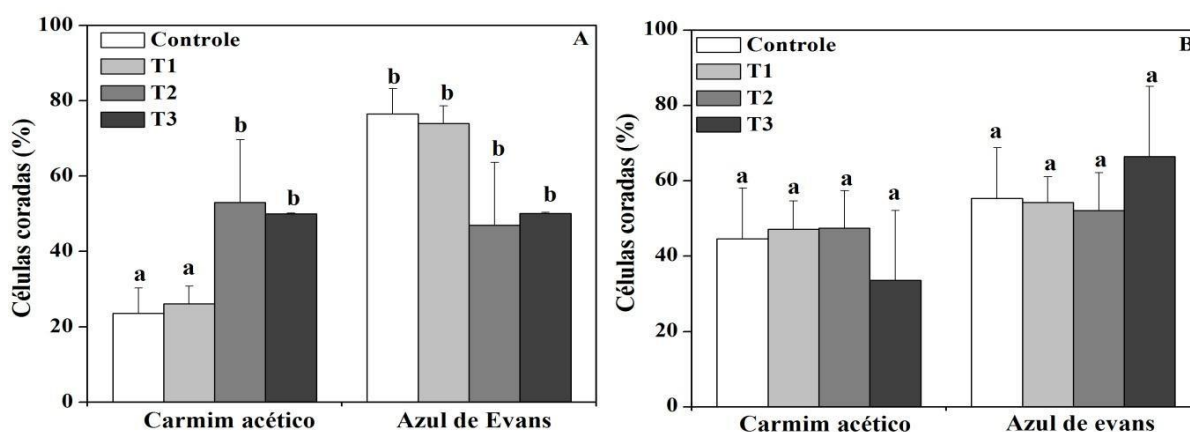


Figura 3: Porcentagem das áreas coradas com carmim acético e Azul de Evans em calos de Ipê roxo. A: calos com 35 dias de subcultivo; B: calos com 70 dias de subcultivo. Letras iguais indicam que os dados não diferem entre si de acordo como o teste de Tukey a 5% de significância. (A: controle; B: 50 mg L⁻¹; C: 100 mg L⁻¹ e D: 200 mg L⁻¹).

Em relação à segunda coleta, com calos de 70 dias de subcultivo, não houve uma diferença significativa entre os tratamentos se comparados quanto aos dois tipos de corantes. Esses dados corroboram com a avaliação de viabilidade dos calos pelo método de TTC, que apresentou uma queda em todos os tratamentos nos calos da segunda coleta.

De acordo com Smertenko et al. (2003), a diminuição dos níveis do regulador de crescimento (2,4 D) pode conduzir ao início de um processo de degradação das massas pró-embriogênicas. Isso corrobora com um padrão de menor viabilidade, segundo a redução por TTC, e de potencial embriogênico dos calos com maior tempo de subcultivo (70 dias).

Nas figuras 4 e 5 pode-se observar o padrão de coloração entre as células dos calos subcultivados com 35 e 70 dias, respectivamente nos diferentes tratamentos testados.

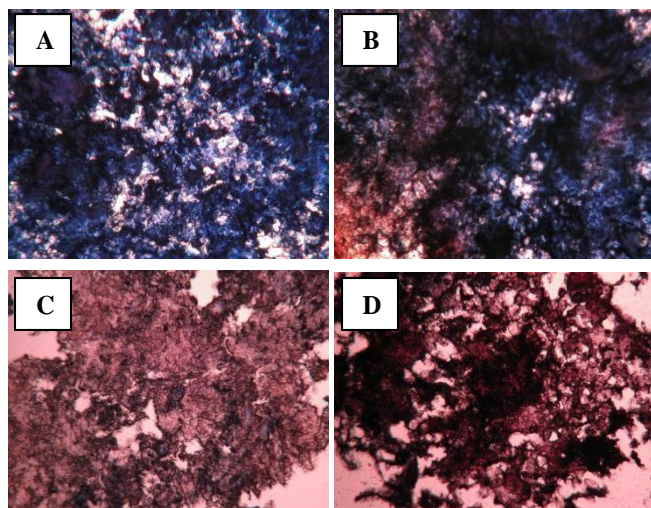


Figura 4: comparação entre os tratamentos de quefirano e grupo controle em calos com 35 dias de subcultivo, fotografados com uso de microscópio de luz com câmera acoplada em objetiva de 5x e zoom operation e avaliado através do método de dupla coloração. (A: controle; B: 50 mg L⁻¹; C: 100 mg L⁻¹ e D: 200 mg L⁻¹).

Na figura 5 é possível comparar os calos subcultivados com 70 dias entre os tratamentos testados, permitindo visualizar massas celulares menos embriogênicas em relação à primeira coleta com 35 dias. Além disso, não houve diferenças significativas de coloração entre os tratamentos. O grupo controle e os demais tratamentos foram corados, em sua maioria, com Azul de Evans.

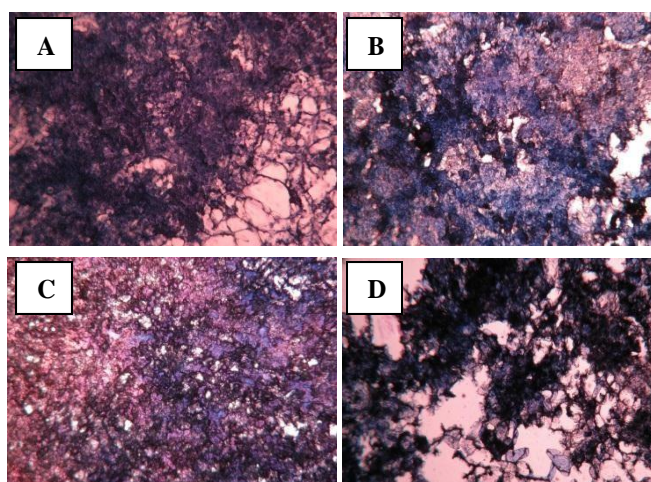


Figura 5: comparação entre os tratamentos de quefirano e grupo controle em calos com 70 dias de subcultivo, fotografados com uso de microscópio de luz com câmera acoplada em objetiva

de 5x e zoom operation e avaliado através do método de dupla coloração. (A: controle; B: 50 mg L⁻¹; C: 100 mg L⁻¹ e D: 200 mg L⁻¹).

6.3 Atividade das enzimas do sistema antioxidante

As figuras 6, 7, 8 e 9 demonstram a atividade da ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), superóxido desmutase (SOD) e guaiacol peroxidase (GPX) medidas através de espectrofotômetro em calos cultivados com 35 e 70 dias.

6.3.1 Atividade da ascorbato peroxidase (APX)

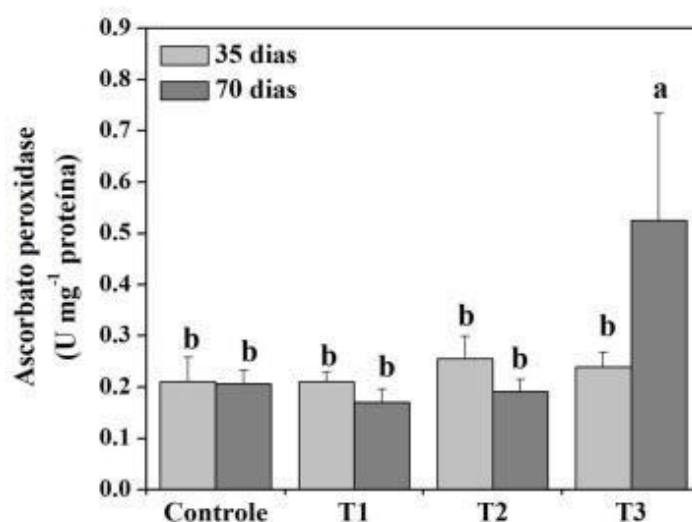


Figura 6: Atividade da enzima APX em calos com 35 e 70 dias de cultivo. Letras iguais indicam que os dados não diferem entre si de acordo como o teste de Tukey a 5% de significância.

Segundo os dados apresentados na figura 6 a atividade da ascorbato peroxidase (APX) em calos com 35 dias de cultivo foi baixa em todos os tratamentos, sem diferenças estatísticas entre os mesmos. Aos 70 dias de cultivo a atividade permaneceu baixa no grupo controle e nos tratamentos com 50 e 100 mg L⁻¹, sendo o tratamento 3 (200 mg L⁻¹) o único a sofrer um aumento significativo. Dessa forma, infere-se que houve uma maior atividade da APX em calos com 70 dias na presença da maior concentração de quefirano (200 mg L⁻¹).

De acordo com os dados da análise de TTC e citoquímica, os calos com 70 dias apresentaram menor viabilidade, o que pode ser explicado por Garcia 2012 em estudos sobre o processo de envelhecimento celular vegetal, no qual ele relata o aumento na concentração de

espécies reativas de oxigênio (EROs) endógena o que leva a uma série de mudanças fisiológicas causadas pelo estresse oxidativo. Isso mostra que a maior concentração de quefirano pode ter contribuído para manter as características físico-químicas das células e, conseqüentemente, no aumento da atividade da ascorbato peroxidase. De acordo com Zhang e Kirkham (1996), a capacidade de manutenção da atividade da SOD, APX e CAT, sob condições de estresses ambientais, é essencial para a manutenção do equilíbrio entre a formação e a remoção do H_2O_2 do ambiente intracelular.

6.3.2 Atividade da catalase (CAT)

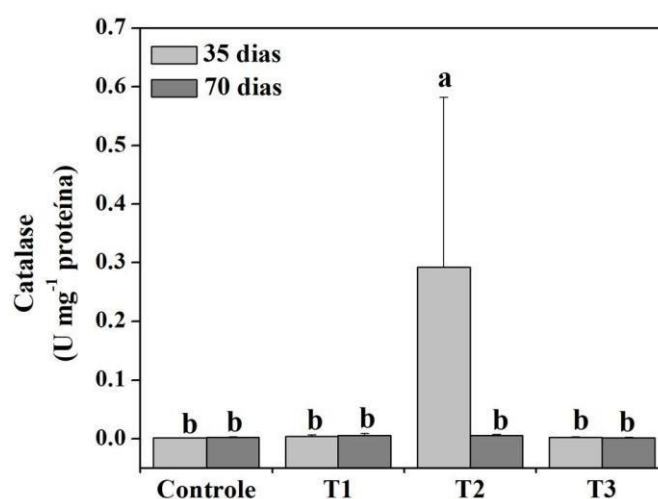


Figura 7: Atividade da enzima CATALASE em calos com 35 e 70 dias de cultivo. Letras iguais indicam que os dados não diferem entre si de acordo como o teste de Tukey a 5% de significância.

A catalase, de modo geral, foi a enzima com menor atividade. O T2 (100 mg L^{-1}) foi o único tratamento com atividade significativa em calos cultivados com 35 dias, já o controle e T1 e T3 tiveram baixa atividade e não diferenciaram estatisticamente entre si. Com 70 dias os calos não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos e atividade foi baixa. Segundo Willekns et al. (1995), a ausência de atividade da catalase em plantas as tornam mais susceptíveis a uma variedade de estresses.

A grande maioria dos trabalhos que analisam a atividade de enzimas antioxidantes (SOD, APX e CAT) relaciona a influência de estresses abióticos e bióticos em diferentes culturas. Nesses casos, a menor atividade dessas enzimas remete a plântulas de baixa viabilidade (Chauhan et al., 2011; Prodanović et al., 2012). Isto nos mostra que a redução da

atividade da catalase no tratamento com 100 mg L^{-1} em calos com 70 dias, pode ser relacionada com a queda da viabilidade celular.

Segundo Cakmak e Horst (1991), a redução na atividade da CAT e o aumento nas atividades das peroxidases indicam que, em plantas mais estressadas, o H_2O_2 gerado é mais consumido em processos oxidativos, como na peroxidação de lipídios, do que eliminado do metabolismo.

6.3.3 Atividade da superóxido desmutase (SOD)

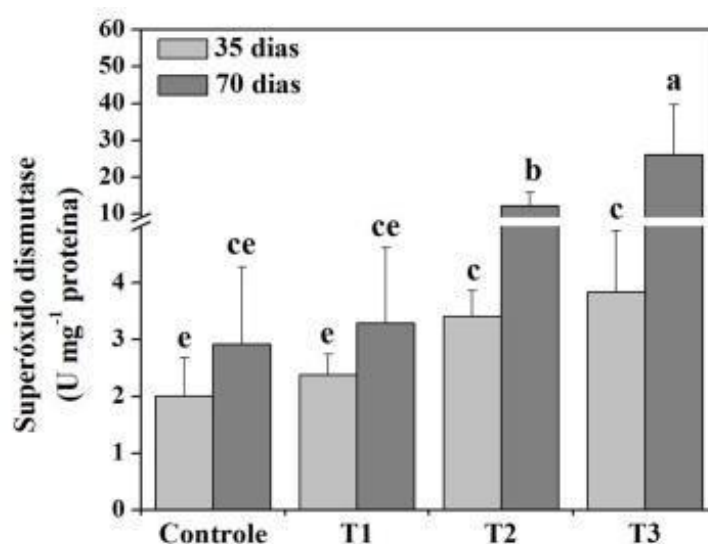


Figura 8: Atividade da enzima superóxido desmutase (SOD) em calos com 35 e 70 dias de cultivo. Letras iguais indicam que os dados não diferem entre si de acordo como o teste de Tukey a 5% de significância.

Em relação aos dados da figura 8, nos tratamentos com 100 e 200 mg L^{-1} (T2 e T3) de quefirano houve maior atividade da superóxido desmutase em calos com 35 dias de cultivo, sem diferenças significativas entre os mesmos. O grupo controle e o tratamento com 50 mg L^{-1} (T1) apresentaram menor atividade e também não diferenciaram entre si estatisticamente.

Na comparação entre os cultivos de 35 e 70 dias, os últimos apresentaram maior atividade. Os tratamentos 2 e 3 (100 e 200 mg L^{-1}) tiveram a maior atividade da SOD, se distinguindo significativamente do grupo controle e T1 (50 mg L^{-1}). Percebe-se que a maior atividade da SOD está relacionada com as maiores concentrações de quefirano no meio de cultura. Ganesan e Jayabalan (2004) também detectaram um aumento na atividade da

superóxido dismutase e peroxidase nos calos de *Gossypium hirsutum* L., os quais produziram maior quantidade de embriões somáticos. Isso pode ser explicado pelo maior potencial de células embriogênicas em T2 e T3 (figura 2), além da maior viabilidade celular desses tratamentos em comparação ao grupo controle (CARVALHO et al., 2009).

6.3.3 Atividade do guaiacol peroxidase (GPX)

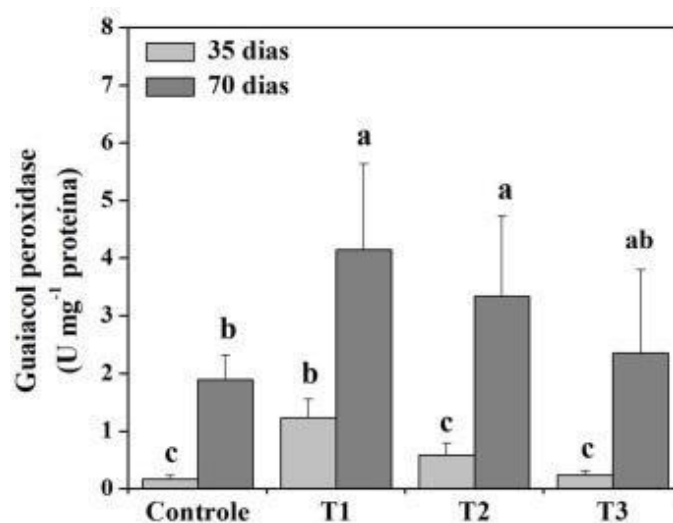


Figura 9: Atividade da enzima guaiacol peroxidase (GPX) em calos com 35 e 70 dias de cultivo. Letras iguais indicam que os dados não diferem entre si de acordo como o teste de Tukey a 5% de significância.

Os dados apresentados sugerem uma atividade mais intensa do guaiacol peroxidase (GPX) nos tratamentos com 50 mg L⁻¹ (T1) em calos com 35 dias de cultivo. Não houve diferenças estatísticas entre o grupo controle e os tratamentos 2 e 3.

Já no cultivo com 70 dias a atividade foi maior em todos os tratamentos se comparado aos calos de 35 dias, sendo que T1 e T2 (50 mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹) demonstraram atividade mais intensa e o grupo controle não apresentou diferenças estatísticas em relação aos tratamentos 3 (200 mg L⁻¹). O guaiacol peroxidase desempenha um papel no sentido de evitar maiores danos às células com baixa viabilidade (FIGUEIREDO, 2013). Isso justifica o aumento da atividade em calos com 70 dias de cultivo, que apresentaram menor viabilidade e potencial embriogênico. Além disso, é perceptível atividade maior da enzima na presença do quefirano, demonstrando que o mesmo auxiliou no mecanismo de defesa das células em situações de estresse.

7 CONCLUSÕES

- ✓ O presente estudo permite concluir que o quefirano teve influência no maior potencial embriogênico das células e na viabilidade celular em calos de ipê roxo.
- ✓ Conclui-se também que o cultivo de 35 dias obteve melhores resultados para a análise do potencial embriogênico e viabilidade das células dos calos.
- ✓ O método de TTC e de dupla coloração foram eficazes para a análise de viabilidade celular e potencial embriogênico das células, respectivamente.
- ✓ O aumento na atividade de enzimas antioxidantes como a SOD na presença de quefirano evidencia a maior resposta de defesa da planta e, conseqüentemente, o potencial elicitador do polissacarídeo para a embriogênese.
- ✓ O quefirano influenciou no aumento da atividade enzimática em calos de ipê roxo com baixa viabilidade celular.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L. V. de. Técnicas para otimização da multiplicação in vitro de brotações de *Eucalyptus citriodora* (Hook) KD Hill & LAS Johnson. Tese de Doutorado. **Universidade de São Paulo**: 2012.

AMMIRATO, P.V. 1983. Embryogenesis. In Handbook of plant cell culture (D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato & Y. Yamada, eds.). **Macmilian Publisher Co.**, New York, p.82-123.

ARNOLD, S. V. et al.; Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant cell, tissue and Organ culture**, v. 69, p. 233-249, 2002.

BISPO, N. B. et al. Indução de embriogênese somática em diferentes explantes de aveia (*Avena sativa* L.). **Ciência Rural, Santa Maria**, v.37, p.890-893, 2007.

BOWLER, Chris; MONTAGU, M. van; INZE, Dirk. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual review of plant biology**, v. 43, n. 1, p. 83-116, 1992.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v.83, p.463-468, 1991.

CAMPOS, R. P., Revestimentos biodegradáveis na conservação de morango orgânico “camarosa” armazenado sob refrigeração. **Maringá**, p. 90. 2008.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, MM de A.; CÂMARA, T. R. Mecanismos antioxidativos associados à embriogênese somática. **Embrapa Algodão-Documentos (INFOTECA-E)**, 2009.

CARVALHO, P. E. R. Espécies florestais brasileiras recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Brasília: **Embrapa/CNPF**, 1994. 640 p.

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

CASTRO, L. M. de. et al.; Somatic embryogenesis from calli of sweet orange cultivars. **Ciência Rural**, v. 40, n. 8, p. 1831-1834, 2010.

CHAUHAN, D. S. et al. Change in storage enzymes activities in natural and accelerated aged seed of wheat (*Triticum aestivum*). **Indian Journal of Agricultural Sciences**, Nova Delhi, v. 81, n. 11, p. 1037-1040, 2011.

DE SOUZA REIS, L. N. R.; LAMEIRA, O. A.; CORDEIRO, I. M. C. C. Indução da Calogênese em Paricá (*Schizolobium parahyba* Var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby)

Através da Adição de AIB e BAP. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 501-503, 2008.

DINIZ, R. O. et al. Atividade antiinflamatória de quefir, um probiótico da medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 19-21, 2003.

DORNELLES, Anita Saraiva; RODRIGUES, Sueli. Alcoholic fermentation of sugarcane juice with kefir granules. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, n. 3, p. 386, 2006.

NOCTOR, Graham; FOYER, Christine H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual review of plant biology**, v. 49, n. 1, p. 249-279, 1998.

FIGUEIREDO, Lucas Diego. Cálcio e boro aliviam a toxidez por H⁺ e Al³⁺ e suprimem a indução de guaiacol peroxidase em raízes do cultivar Micro-Tom de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.): possível envolvimento da parede celular. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo. 2013.

FRANÇA NETO, J. de B.; KRZYŻANOWSKI, Francisco Carlos; DA COSTA, Nilton Pereira. O teste de tetrazólio em sementes de soja. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**, 1998.

GANESAN, M.; JAYABALAN, N. Evaluation of haemoglobin (erythrogen): for improved somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2). **Plant Cell Rep**, v. 23, p. 181-187, 2004.

GARCIA, C. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze sob condições controladas de armazenamento. Dissertação (Mestrado em Ciências área de concentração Recursos Genéticos) – **Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis, 2012.

GARCÍA-LIMONES, C. et al. Changes in the redox status of chickpea roots in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*: apoplastic antioxidant enzyme activities and expression of oxidative stress-related genes. **Plant Biology**, v. 11, n. 2, p. 194-203, 2002.

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

GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture. Part I – the technology. **Edington: Exegetics**, 1996. 574 p.

GILL, Sarvajeet Singh; TUTEJA, Narendra. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GUPTA, Praymod K.; DURZAN, Don J. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. **Nature Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 147-151, 1987.

HUSEYNOVA, Irada M.; ALIYEVA, Durna R.; ALIYEV, Jalal A. Subcellular localization and responses of superoxide dismutase isoforms in local wheat varieties subjected to continuous soil drought. **Plant physiology and biochemistry**, v. 81, p. 54-60, 2014.

- JAIN, S. M. Tissue culture derived variation in crop improvement. **Euphytica**, v.118, p.153-166, 2001.
- JEBARA, Salwa et al. Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. **Journal of plant physiology**, v. 162, n. 8, p. 929-936, 2005.
- JIMENEZ, Ana et al. Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. **Planta**, v. 214, n. 5, p. 751-758, 2002.
- KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas in vitro. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 1, n. 1, p. 30-33, 1997.
- KHILWANI, Barkha et al. Direct somatic embryogenesis and encapsulation of somatic embryos for in vitro conservation of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 127, n. 2, p. 433-442, 2016.
- LI, C. J.; WANG, C.; PARDEE, A. B.; Induction of apoptosis by beta-lapachone in human prostate cancer cells. **Cancer Research**, v. 55, p. 3712-3715, 1995.
- LLOYD, G.; MCCOWN. B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. In: **Int. Plant. Prop. Soc.** p. 421-427. 1980
- LYNGEVED, R.; SNIPEN, L.G.; IVERSEN, T.H.; HVOSLEF-EIDE, A.K. Influence of potential growth factors on the production of proembryogenic masses of *Cyclamen persicum* Mill. In bioreactors. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 118, n. 2, p. 53-59. 2008
- LORENZI, Harri; MATOS, Francisco J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2002.
- MESQUINI, K. R. et al. Efeito de produtos naturais na indução de fitoalexinas em cotilédones de soja e na germinação de uredinósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 20007, n. 2, p. 1091-1094, 2007.
- MICHELI, L; Uccelletti, D.; Palleschi, C.; Crescenzi, V.; **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 1999, 53, 69.
- MIKUŁA, A.; NIEDZIELSKI, M.; RYBCZYŃSKI, J. J. The use of TTC reduction assay for assessment of *Gentiana* spp. cell suspension viability after cryopreservation. **Acta Physiol Plant**, v-28, p. 315–324, 2006.
- MIZUNO, Masashi; KAMEI, Michiyo; TSUCHIDA, Hironobu. Ascorbate peroxidase and catalase cooperate for protection against hydrogen peroxide generated in potato tubers during low-temperature storage. **IUBMB Life**, v. 44, n. 4, p. 717-726, 1998.
- MOORE, R. P. Tetrazolium staining for assessing seed quality. **Seed ecology**, p. 11-23, 1973.
- MORDHORST, A. P. et al. Plant embryogenesis. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 16, n. 6, p. 535-576, 1997.

MUNHOZ, M., C. F. P. da Luz, P. E. Meissner Filho, O. M. Barth, and F. Reinert. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Rev. Brasileira de Botânica**, 31(2): 209-214, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-479, 1962.

NOGUEIRA, R. C. Propagação in vitro, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **UFLA**, 2003.

OTLE, S.; CAGINDI, O. Kefir: a probiotic dairy-composition nutritional and therapeutic aspects. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 54-59, 2003.

PASTERNAK, T. P.; AYAYDIN, E. P. F.; MISKOLCZI, P.; POTTERS, G.; ASARD, H.; ONCKELEN, H. A. V.; DUDITS, D.; FEHÉR, A. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. **Plant Physiology**, v. 129, p. 1807-1819, 2002.

PEREIRA, F.J. et al. Evolução da anatomia radicular do milho, „Saracura” em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.12, p.1649-1656, 2008.

PEREIRA, A. R. Embriogênese somática direta em *Coffea arábica* L. Acaiaí Cerrado. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – **Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG**: 60p. 2005.

PRODANOVIĆ, O., PRODANOVIĆ, R., ANOVIĆ PRISTOV, J. B., MITROVIĆ, A. & RADOTIĆ, K. Effect of cadmium stress on antioxidative enzymes during the germination of Serbian spruce [*Picea omorika* (Panc.) [Purkyne]. **African Journal of Biotechnology**, 11(52): 11377-11385. 2012.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. Projeto madeira do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: **Secretaria de Agricultura e Abastecimento**, 1988. 524 p.

SANTOS, Dalíhia Nazaré dos et al. Análise bioquímica de calos de pinhão-manso. **Ciência Rural**, v. 40, n. 11, 2010.

SATISH, Lakkakula et al. Influence of plant growth regulators and spermidine on somatic embryogenesis and plant regeneration in four Indian genotypes of finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 124, n. 1, p. 15-31, 2016.

SCHULZE, M.; GROGAN, J.; UHL, C.; LENTINI, M.; VIDAL, E. Evaluating ipê (Tabebuia, Bignoniaceae) logging in Amazonia: Sustainable management or catalyst for Forest degradation? **Biological Conservation**, v. 141, p. 2071–2085, 2008.

SILVA, F. G. Estudos de calogênese in vitro e dos efeitos do manejo fitotécnico no crescimento e na produção de óleo essencial em plantas de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.]. Lavras, MG: **UFLA**, v. 128, 2001.

SMERTENKO, A. P.; BOZHKO, P. V.; FILONOVA, L. H.; von ARNOLD, S.; HUSSEY, P. J. Re-organisation of the cytoskeleton during developmental programmed cell death in *Picea abies* embryos. **The Plant Journal**, 33:813–824, 2003.

STEINER, N.; VIEIRA, F. N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 6, p. 895-903, Nov. 2005.

TORRES, A. C. et al. Glossário de biotecnologia vegetal. Brasília: **EMBRAPA Hortaliças**, 2000. 128 p.

VALENTE, C. Caracterização de fungos mitocondriais de *Araucaria angustifolia*. Dissertação de Mestrado. Curitiba PR: **Universidade Federal do Paraná**. 2007. 97p

VENTURIERI, G. A.; VENTURIERI, G. C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae). **Acta Amazônica**, v. 34, p. 507-511, 2004.

VERLEYSEN, H., Samyn, G., Van Bockstaele, E. & Debergh, P. Evaluation of analytical techniques to predict viability after cryopreservation. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 77, 11–21 (2004).

VOGEL, G. How does a single somatic cell become a whole plant? **Science**, v. 309, n. 5731, p. 86, 2005.

WILLEKENS, Hilde et al. Catalases in plants. **Molecular Breeding**, v. 1, n. 3, p. 207-228, 1995.

WUERZBERGER, S.; PINK, J. J.; PLANCHON, S. M. Induction of apoptosis in MCF-7: WS8 breast cancer cells by beta-lapachone. **Cancer Research**, v. 58, p. 1876-1885, 1998.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical journal**, v. 57, n. 3, p. 508, 1954.

ZHANG, J.; KIRKHAM, M.B. Lipid peroxidation in sorghum and sunflower seedlings as affected by ascorbic acid, benzoic acid, and propyl gallate. **Journal of Plant Physiology**, v.149, n.5, p.489-493, 1996.