

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**GLEIKA MARIA MARQUES**

**EFEITO DO USO DE CITOCININAS NO POTENCIAL EMBRIOGÊNICO E  
OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS EM CALOS DE JEQUITIBÁ-ROSA *Cariniana*  
*legalis* (MART.) O. KUNTZE**

**Alfenas/MG**

**2021**

GLEIKA MARIA MARQUES

EFEITO DO USO DE CITOCININAS NO POTENCIAL EMBRIOGÊNICO E  
OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS EM CALOS DE JEQUITIBÁ-ROSA *Cariniana*  
*legalis* (MART.) O. KUNTZE

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Ambientais

Orientador: Prof. Dr. Breno Régis Santos

Alfenas/MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

M357e Marques, Gleika Maria.  
Efeito do uso de citocininas no potencial embriogênico e obtenção de protoplastos em calos de jequitibá-rosa *cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze. / Gleika Maria Marques. – Alfenas/MG, 2021.  
64f.: il. –

Orientador: Breno Régis Santos.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal de Alfenas, 2021.  
Bibliografia.

1. Técnicas de Embriologia Somática de plantas. 2. Técnicas de Cultura de Tecidos. I. Santos, Breno Régis. II. Título.

CDD-577

**GLEIKA MARIA MARQUES**

**EFEITO DO USO DE CITOCININAS NO POTENCIAL EMBRIOGÊNICO E  
OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS EM CALOS DE JEQUITIBÁ-ROSA *Cariniana*  
*legalis* (MART.) O. KUNTZE**

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

Aprovada em: 31 de Agosto de 2020

Prof. Dr. Breno Régis Santos  
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Prof. Dr. Plínio Rodrigues dos Santos Filho  
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriano Bortolotti da Silva  
Universidade José do Rosário Vellano

Assinatura:



---

Documento assinado eletronicamente por **Plínio Rodrigues dos Santos Filho, Professor do Magistério Superior**, em 31/08/2020, às 15:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



---

Documento assinado eletronicamente por **Breno Régis Santos, Professor do Magistério Superior**, em 31/08/2020, às 15:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



---

Documento assinado eletronicamente por **ADRIANO BORTOLOTTI DA SILVA, Usuário Externo**, em 31/08/2020, às 15:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



---

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0363924** e o código CRC **2382C068**.

---

À minha mãe Rosana, sem a qual nenhuma  
*conquista seria possível.*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à minha mãe Rosana por me apoiar em todas as minhas escolhas. Sem sua disponibilidade incondicional fez tudo o que o dia eu sonhei se tornar realidade.

Às minhas irmãs Glenda e Anny por estarem de longe sempre acreditando e compartilhando a esperança de um futuro próspero.

Agradeço ao meu amigo Anderson por há anos estar em minha vida participando dos momentos bons e ruins. Sem você eu nunca conheceria a UNIFAL-MG, o BIOGEN e todas suas incríveis linhas de pesquisa. Mais que amigo te considero como um irmão!

Ao meu orientador Breno Régis Santos por me aceitar como sua orientanda. Mesmo sabendo que vinha de uma linha de pesquisa diferente, aceitou abrir as portas do laboratório para que eu pudesse aprender e desenvolver novas habilidades. Obrigada pela confiança, paciência e por transmitir essa calma nos momentos que eu chegava desesperada. Mais uma vez obrigada!

Aos queridos João e Geovana por me ajudar e ensinar tantas coisas dentro do Biogen! Posso afirmar que a conclusão desse trabalho não seria possível sem vocês dois! Duas mentes brilhantes! Agradeço também às pessoas incríveis que conheci no Biogen e na Unifal: Pâmela, Daniela, Alessander, Max, Valdir, Letícia, Kamila, Josi, Gabi, Pedrão, Professor Thiago, Professor Sandro, Ana Lúcia e Síria. Os dias foram mais leves com vocês por perto.

Agradeço muito minhas queridas meninas Denise e Viviane, responsáveis pelas burocracias diárias. Obrigada pela paciência, pelas conversas, pelas risadas, e por me aguentar perguntando de bolsa. Vocês duas são simplesmente demais!

Aos meus amigos dos bastidores que vieram da Biologia Cayque e Laís. Sorte de ter pessoas especiais como vocês! Estamos juntos nessa jornada agrídoce que é ser um biólogo. Grata por compartilharem comigo momentos tão únicos mesmo estando longes! Da Biologia para a vida!

Certamente agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para esta conquista, minha eterna gratidão. Essa conquista também é de vocês.

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

Desprezando a Conservação da Biodiversidade, estamos desprezando o futuro da espécie humana.

(JOSÉ ALOÍSIO PORTES)

## RESUMO

O Jequitibá-rosa é uma espécie lenhosa da Mata Atlântica de alto valor econômico e ecológico. Com poucos indivíduos na natureza, atualmente se encontra ameaçada de extinção segundo a IUCN. Dessa forma faz-se necessário o aprimoramento de técnicas de propagação vegetativa de tal espécie, sendo que a embriogênese somática e cultura de protoplastos são estratégias promissoras apontada para tal. A primeira parte do presente estudo buscou investigar o efeito de diferentes concentrações dos reguladores de crescimento da classe das citocininas BAP (6-benzilaminopurina) e KIN (Cinetina) no potencial embriogênico de calos de Jequitibá-rosa. Todos os tratamentos passaram por análise citoquímica com os corantes azul de Evans e carmim acético a fim de identificar a presença de células com atividade embriogênica. Dentro dos tratamentos testados, aqueles que apresentaram os melhores resultados para a presença de células embriogênicas foram T0 MC e ME: 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN, T3 (ME): 10,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN e T4 (B): 10,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3,0 mg L<sup>-1</sup> KIN. Tais tratamentos foram então submetidos a análise histológica que demonstrou que não havia a presença de estruturas relacionadas à embriões somáticos em nenhum desses tratamentos. Em contrapartida, foi identificada a presença de substância que se assemelham a matriz extracelular, fazendo-se necessário maiores estudos dessa natureza com a espécie. A segunda parte desse estudo teve como objetivo a obtenção de protoplastos através de calos de Jequitibá-rosa. Os calos foram induzidos em meios de cultura WPM 3 mg/L<sup>-1</sup> BAP (6-benzilaminopurina) e 0,1 mg/L<sup>-1</sup> ANA (Ácido Naftaleno Acético). Para a degradação da parede celular, as células calosas foram submetidas a um tratamento com solução enzimática de celulase, pectinase em manitol junto com a solução W5. Foram realizados os testes de viabilidade celular por meio de contagem de células com azul de Evans 1%, com auxílio da câmara de Neubauer, e testada a influência da solução W5 na regeneração de protoplastos. Foi constatado que o uso da solução W5 não gerou diferença na obtenção de células.

Palavras-chave: Embriogênese somática. Cultura de tecidos. Histologia lenhosas.

## ABSTRACT

Jequitibá-rosa is a woody species from the Atlantic Forest of high economic and ecological value. With few individuals in the wild, it is currently threatened with extinction according to IUCN. Thus, it is necessary to improve techniques of vegetative propagation of such species, and somatic embryogenesis and culture of protoplasts are promising strategies aimed at such. The first part of the present study sought to investigate the effect of different concentrations of growth regulators of the class of cytokinins BAP (6-benzylaminopurine) and KIN (Cinetina) on the embryogenic potential of Jequitibá-rosa calluses. All treatments underwent cytochemical analysis with Evans blue dyes and acetic carmine in order to identify the presence of cells with embryogenic activity. Within the tested treatments, those that showed the best results for the presence of embryogenic cells were T0 MC and ME:  $0.0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $0.0 \text{ mg L}^{-1}$  KIN, T3 (ME):  $10.0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $0.0 \text{ mg L}^{-1}$  KIN and T4 (B):  $10.0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$  KIN. Such treatments were then submitted to histological analysis which demonstrated that there were no structures related to somatic embryos in any of these treatments, but the presence of substances that resemble the extracellular matrix was identified, making further studies of this nature necessary with the species. The second part of this study aimed to obtain protoplasts through calluses induced by clones from specimens from Paraguaçu, Machado and Divisa Nova. The calluses were induced in WPM  $3 \text{ mg/L}^{-1}$  BAP (6-benzylaminopurine) and  $0.1 \text{ mg/L}^{-1}$  ANA (Naphthalene Acetic Acid) culture media. For the degradation of the cell wall, the callous cells were submitted to a treatment with enzymatic solution of cellulase, pectinase in mannitol together with the W5 solution. Cell viability tests were carried out by counting cells with Evans blue 1%, with the aid of the Neubauer chamber, and the influence of the W5 solution on the regeneration of protoplasts was tested. It was found that the use of the W5 solution did not generate a difference in obtaining cells, making further studies necessary.

Keywords: Somatic embryogenesis. Tissue culture. Histology woody.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
2.1	O JEQUITIBÁ-ROSA.....	14
2.2	EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	17
2.3	PROTOPLASTOS VEGETAIS.....	19
2.4	REGULADORES DE CRESCIMENTO.....	21
2.5	ANÁLISE CITOQUÍMICA E ANÁLISE HISTOLÓGICA PARA ESTUDOS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	23
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>25</b>
	<b>ARTIGO 1 - POTÊNCIAL EMBRIOGÊNICO DE CALOS DE JEQUITIBÁ-ROSA CULTIVADOS NA PRESENÇA DE CITOCININAS).....</b>	<b>32</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
2.1	MATERIAL VEGETAL.....	35
2.2	INDUÇÃO DE CALOS.....	36
2.3	ANÁLISE CITOQUÍMICA.....	36
2.4	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	37
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>46</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>47</b>
	<b>ARTIGO 2 - OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS DOS GENÓTIPOS MODELOS DE JEQUITIBÁ-ROSA REMANESCENTE DO SUL DE MINAS GERAIS .....</b>	<b>51</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>54</b>
2.1	MATERIAL VEGETAL.....	54
2.2	PREPARO DE SOLUÇÕES.....	55
2.3	ISOLAMENTO DE PROTOPLASTOS.....	56
2.4	ANÁLISE DE VIABILIDADE DE CÉLULAS SUSPENSAS.....	57
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>

3.1	ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR.....	58
3.2	ANÁLISE DE VIABILIDADE DE PROTOPLASTO.....	59
3.3	TESTE DE FATORIAL DUPLO.....	61
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>62</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>62</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui uma das maiores diversidades arbóreas do mundo, sendo que mais de 50% das espécies nativas se encontram na Floresta Amazônica e na Mata Atlântica. Desta última restam apenas 7,26% da sua cobertura original devido à ocupação urbana, avanço das fronteiras agrícolas, falta de direcionamento técnico e conscientização ecológica na exploração dos recursos florestais. Deste modo espécies de grande valor ambiental, histórico, econômico e social estão em vias de extinção, assim como a fauna e flora dependentes destas espécies (PILATTI *et al.*, 2011; LORENZI, 2016).

A *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze, conhecida popularmente como Jequitibá-rosa, é uma espécie da família Lecythidaceae, nativa da Mata Atlântica e considerada uma das maiores e mais longínquas árvores da flora brasileira. Além de ser considerada uma espécie de alto valor cultural e histórico, o Jequitibá-rosa possui uma madeira nobre altamente apreciada pelo setor madeireiro, utilizada principalmente em acabamentos internos e fabricação de móveis (LORENZI, 2016).

Atualmente a espécie se encontra ameaçada devido intensa exploração madeireira e corte seletivo de forma que se encontra classificada na categoria vulnerável pela IUCN (LEAL *et al.*, 2014; IUCN, 2020). Sua propagação *in natura* é limitada uma vez que depende diretamente de sementes que são escassas, de difícil coleta e possuem rápida perda de viabilidade (LEAL *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2016).

Em 2015 o Jequitibá-rosa foi símbolo de uma campanha voltada para sua preservação assim como de florestas, em especial a Mata Atlântica. Organizado pelo Grupo de Pesquisa Amazônica em Transformação do IEA (Instituto de Ciências Avançadas-USP), Centro Nacional de Conservação da Flora (CMCFlora) e pelo Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica (CNRBMA), a campanha contou com a elaboração de um Plano de Ação de Nacional (PAN) para a conservação *in situ* e *ex situ* da espécie. O tema do debate intitulado “Vamos salvar os Jequitibás-rosa da extinção” pontuou a importância dessa imponente espécie e das florestas para a provisão de serviços ecossistêmicos. Embora projetos de proteção à espécies apontem a conservação *in situ* como a mais efetiva, em alguns casos os esforços para tal são de tamanha dificuldade que se faz necessário medidas alternativas como o cultivo *ex situ* em laboratórios e casa de vegetação.

Nesse contexto, a propagação vegetativa é uma ferramenta viável, apontada como uma solução para reprodução de espécies lenhosas ameaçadas e com dificuldade de propagação natural assim como o Jequitibá-rosa. Uma das estratégias eficientes para promover a conservação envolvendo a propagação vegetativa consiste na criação de banco de germoplasma *ex situ*. Nesse caso, um método que conhecido é a propagação de plantas *in vitro* através da embriogênese somática (ES) (GUERRA *et al.*, 1999; PAIS, 2019). A embriogênese somática tem sido reconhecida como uma abordagem ideal para propagação clonal, melhoramento genético, especialmente de espécies lenhosas que apresentam um ciclo de vida muito longo (GUAN *et al.*, 2016).

O sucesso na obtenção de embriões via embriogênese somática depende de uma série de fatores como a qualidade dos explantes, estímulos externos como temperatura e luminosidade, composição do meio de cultivo, tempo de indução e a presença de reguladores de crescimento (NAWROT-CHORABIK; PIETRYKOWSKI, 2018). Os reguladores de crescimento são um fator chave que possui relação direta com o desenvolvimento vegetal e na ES de espécies lenhosas são amplamente estudados seus efeitos, conforme relatado nas revisões de Guan *et al.*, 2016; Pais, 2019.

Uma investigação detalhada das etapas envolvidas no processo de ES é indispensável para que seja possível a compreensão dos mecanismos e das respostas de cada espécie para a obtenção de embriões viáveis. Uma vez que os mecanismos da ES são elucidados é possível obter centenas de indivíduos através de um pequeno explante, os quais ainda podem ser, em um segundo momento, passar pelo processo de criopreservação, sendo então, conservados por períodos indefinidos. Nawrot-Chorabik; Pietrzykowski (2018) apontam como o desenvolvimento da embriogênese somática através de calos se configura como uma alternativa indispensável para a propagação de árvores, especialmente para a preservação daquelas que se encontram ameaçadas e que possuem importância econômica e ecológica.

Outro método utilizado para estudos que envolvem a cultura de tecidos vegetais e o aprimoramento no cultivo de plantas é a obtenção de protoplastos. Os protoplastos são células vegetais desprovidas de parede celular, onde a superfície celular está totalmente exposta e acessível e, portanto, fornece o ponto de partida a várias técnicas de manipulação genética ou de hibridação somática de células

vegetais para o melhoramento das culturas (REZAZADEH; NIEDZ, 2015; LING *et al.*, 2010; AYELESO, 2015). Quando a célula recebe os estímulos físicos e químicos corretos, os protoplastos gerados são considerados viáveis e totipotentes, de forma que são capazes de regenerar uma nova parede e sofrer repetidas divisões mitóticas e partir de então regenerar plantas férteis através do processo de cultura de tecidos.

Estudos dessa natureza envolvendo técnicas de cultura de tecidos com o Jequitibá-rosa ainda são inexistentes. Dentro deste contexto o presente projeto buscou estudar a competência embriogênica e a produção de protoplastos através de calos de Jequitibá-rosa cultivados na presença dos reguladores de crescimento da classe das citocininas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

O Jequitibá-rosa é uma das maiores espécies do Bioma Mata Atlântica. Atualmente encontra-se ameaçada por possuir baixa densidade populacional em poucos remanescentes florestais. Por possuir potencial econômico, ecológico, social e histórico, é de extrema importância que esforços sejam feitos em prol de sua conservação. Indução de embriogênese somática e produção de protoplastos vegetais são algumas técnicas dentro da cultura de tecidos que são extremamente promissoras para tal.

### 2.1 O JEQUITIBÁ-ROSA

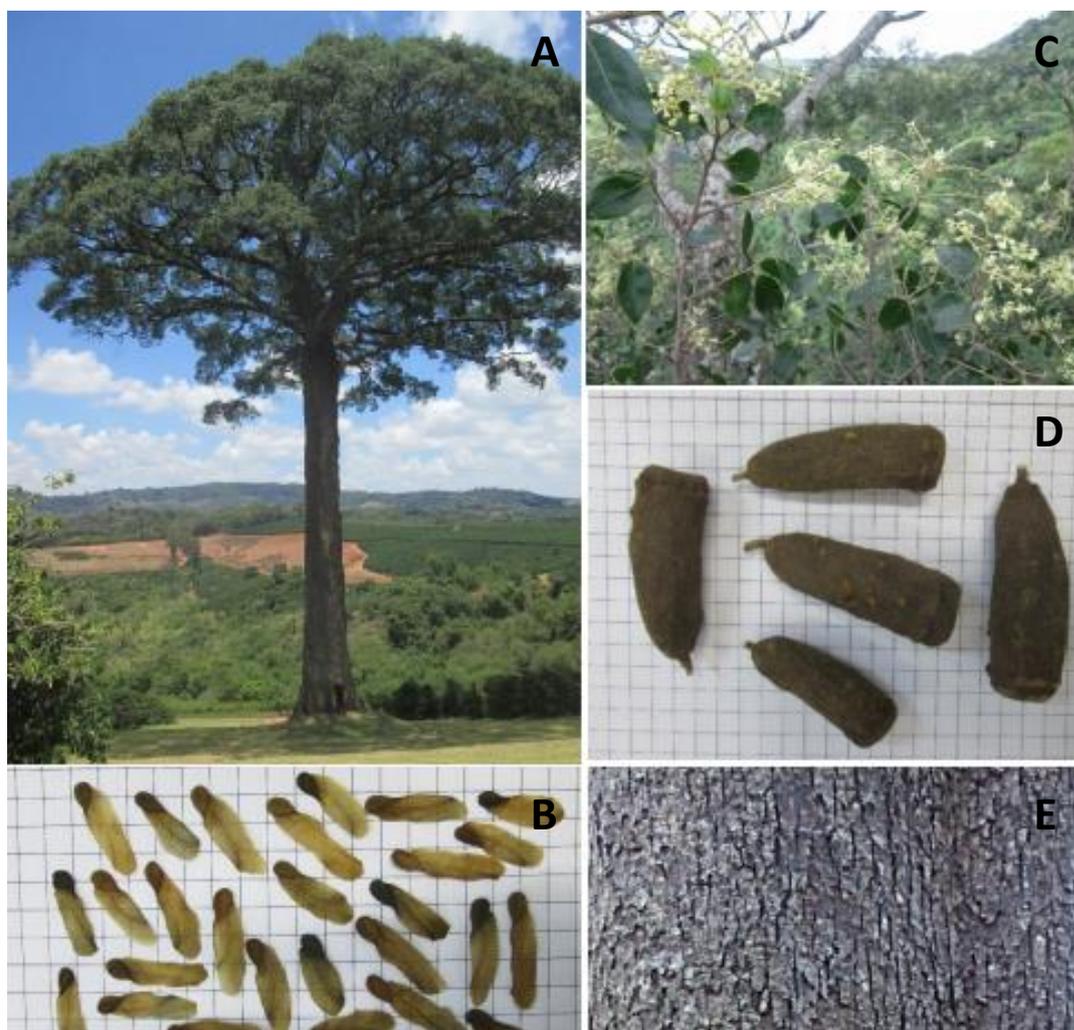
A espécie *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze, popularmente conhecida como Jequitibá-rosa, pertence à família Lecythidaceae e no Bioma Mata Atlântica, do qual é nativa, é considerada uma das espécies mais altas (TAMBARUSSI *et al.*, 2015). Apresenta de 30 a 50 m de altura e tronco de 70 a 100 cm de diâmetro, revestido por casca pardacenta e fissurada. Possui flores dioicas, pequenas de coloração creme, que florescem durante os meses de dezembro e fevereiro. Seus frutos são classificados como pixídio capsular alongado e lenhoso, encimado por opérculo (tampa) com abertura íntegra (Figura 1). Em cada fruto possui de 10 a 15 sementes, sendo que a maturação dos frutos verifica-se no período de agosto-dezembro (LORENZI, 2016; CARVALHO, 2005).

A madeira do Jequitibá-rosa é considerada nobre, empregada para a construção civil, obras internas e movelaria. Dada a sua importância e as potencialidades de uso, esta espécie foi agrupada na lista das “espécies madeireiras promissoras”, por apresentar valor econômico comprovado, com produção de madeira valiosa e aptidão para programas de regeneração artificial (RÊGO & POSSAMAI, 2004; LORENZI, 2016).

O Jequitibá-rosa também se caracteriza como uma espécie de grande valor ecológico. Já foi descrita a importância da mesma para a manutenção da diversidade e riqueza de espécies epífitas, de tal forma que esses organismos ocorrem em maior abundância e exclusividade no Jequitibá do que em outras espécies arbóreas (REIS; FONTOURA, 2009). Além disso, é uma espécie utilizada como habitat para uma grande diversidade de insetos, aves, répteis e primatas que

se alimentam e procriam em sua copa. Por esta razão é recomendável a utilização de Jequitibás-rosa nos reflorestamentos mistos com fins ecológicos e também para o manejo da fauna e da flora (LORENZI, 2016).

Figura 1 - *Cariniana legalis*, O Jequitibá-rosa.



Fonte: DOS SANTOS (2016. p.13).

Legenda: a) *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze. Pessoa adulta em sua base demonstrando a altura e imponência da espécie

- b) Semente
- c) Flor e Folha
- d) Fruto
- e) Casca

Existem indivíduos que são monumentos naturais e turísticos no Brasil, tais como: o Jequitibá-rosa do Parque estadual de Vassununga em Santa Rita de Passa Quatro-SP; o Jequitibá do Instituto Cabruca-BA; o Jequitibá de João Neiva-ES; o Jequitibá de Ipatinga-MG. No Sul de Minas Gerais, os Jequitibás: da Divisa Nova;

Cachoeira de Machado e Rio Sapucaí em Paraguaçu. O Jequitibá-rosa do Instituto Cabruca, situado num sistema agroflorestal, na região cacaueira de Camacan, sul da Bahia é considerado atualmente o maior do Brasil, com 41m de altura e 4,27 m de DAP (INSTITUTO CABRUCO, 2014).

Atualmente a *Cariniana legalis* é considerada uma espécie em vias de extinção, na categoria vulnerável pela International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, IUCN, apresentando um reduzido número de exemplares com ocorrência natural, e uma densidade populacional de < 1 árvore/hectare (IUCN, 2019; LEAL *et al.*, 2014). A ameaça sobre essa espécie se dá principalmente pela ocorrência de suas poucas populações em solos propensos a agricultura.

Rêgo e Possamai (2004) após terem estudado a germinação e desenvolvimento inicial do Jequitibá-rosa afirmaram que suas sementes são recalcitrantes e à medida que aumenta o tempo de armazenamento, a partir de 30 dias após a colheita, a viabilidade delas diminui significativamente. Recentemente um estudo com a germinação de Jequitibá-rosa mostrou que após colheita as sementes possuíam uma taxa de 78% de germinação, a qual caiu para 49.5% após seis meses de armazenagem (ARAGÃO *et al.*, 2019).

Embora o intervalo de germinação de sementes da espécie seja bom, existem limitações para a produção de mudas por sementes. Alguns indivíduos florescem intensamente, mas produzem poucas sementes, devido a diversos fatores tais como a baixa eficiência no transporte de pólen, ou em espécies zoófilas, com polinizadores pouco especializados, fazendo com que poucos estigmas recebam pólen compatível; problemas com animais pilhadores, furtadores e frugívoros (aves e macacos), que utilizam os recursos florais ou competem com os polinizadores potenciais; provocando uma perda considerável de flores (GATTI, 2002). Outros problemas apontados é o baixo número de indivíduos da espécie, pequena quantidade de sementes viáveis e o processo de coleta das mesmas, já que em árvores gigantes como o jequitibá é necessário utilizar técnicas de escalada (LORENZI, 2016).

Diante do quadro de ameaça do Jequitibá-rosa, faz-se necessário programas de conservação da espécie a fim de manter sua integridade e viabilidade genética. Programas de conservação *in situ* devem por sua vez, estar aliados à estratégias de conservação *ex situ*. Métodos de micropropagação *in vitro* são capazes de multiplicar espécies em larga escala, além de promover sua conservação por

extenso período com técnicas de criopreservação. Em relação ao Jequitibá-rosa, a cultura de tecidos vegetais ainda é uma ferramenta biotecnológica pouco explorada, de forma que a obtenção de embriões via embriogênese somática ainda não foi descrita.

## 2.2 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

O termo cultura de tecidos vegetais tem sido empregado para definir a cultura *in vitro* de células, tecidos, órgãos e seus componentes sob condições assépticas e controladas (SILVA-NETO; ANDRADE, 2011). Essa prática se baseia no princípio da totipotência que considera que as células vegetais manifestam, em determinados momentos e sob estímulos apropriados, a potencialidade de dar origem a um novo indivíduo multicelular (BEVITORI, 2013).

A embriogênese somática (ES) é uma das técnicas utilizadas na cultura de tecidos vegetais. Também chamada de adventícia ou assexual, pode ser definida como o processo pelo qual células somáticas sob condições determinadas dão origem à células embriogênicas, as quais sofrem uma série de mudanças bioquímicas e morfológicas que resultam na formação de embriões somáticos (PINHAL *et al.*, 2011).

A ES é uma das vias pelas quais as células vegetais em cultura podem ser regeneradas em plantas na ausência de um meristema ativo. Diferente da embriogênese zigótica, na ES os embriões não apresentam conexões vasculares com o tecido materno, no entanto possuem meristemas apicais e radiculares podendo, portanto germinar (STEINER *et al.*, 2012; ISAH 2016).

A ES pode ser direta ou indireta. A ES direta ocorre quando a formação dos embriões se dá diretamente da superfície do explante utilizado. No modelo indireto a formação de embriões somáticos se dá a partir de um calo, que apresenta células em diferentes graus de determinação, as quais, dependendo do meio de indução, podem adquirir novas competências (SANTA-CATARINA *et al.*, 2013).

A massa calosa intermediária nem sempre possui a competência embriogênica esperada para a produção de novos embriões. É possível ocorrer na mesma região do calo células competentes e células não competentes. As células com potencial embriogênico apresentam um conjunto de características comuns ao comportamento de células embrionárias em divisão ativa. Estas características são:

tamanho pequeno, conteúdo citoplasmático denso, núcleos grandes com nucléolos proeminentes, vacúolos pequenos e presença de grãos de amido (Figura 2) (GUERRA *et al.*, 1999; GEORGE *et al.*, 2008).

Segundo Von Arnold (2002) a ES é composta de cinco etapas: 1) iniciação de culturas embriogênicas em meios de cultura contendo reguladores de crescimento vegetal (normalmente com ação de auxinas); 2) multiplicação das culturas embriogênicas em meios de cultura similares aos utilizados na indução ou diferentes; 3) pré-maturação de embriões em meios de cultura sem a presença, de fitorreguladores, 4) maturação dos embriões; 5) conversão em plantas em meios de cultura isentos de fitorreguladores.

A utilização desse método de ES tem como vantagem a produção de grande quantidade de embriões, os quais podem apresentar uniformidade morfológica e pureza genética. Por esse motivo, o método além de ser útil para a clonagem e a propagação vegetativa de plantas, também pode servir como modelo de estudo dos eventos moleculares, citológicos e fisiológicos que estão envolvidos na ES e zigótica de plantas (DODEMAN *et al.*, 1997; QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006; FLOH *et al.*, 2015).

Em espécies lenhosas a ES desempenha um papel significativo na propagação clonal, além de ser uma forte ferramenta na produção de sementes sintética, conservação de germoplasma e criopreservação (CHIANCONE; GERMANÀ, 2013; OZUDOGRU *et al.*, 2010; GUAN *et al.*, 2016).

Em eudicotiledôneas o padrão de desenvolvimento do embrião somático apresenta muitas características morfológicas semelhantes a do embrião zigótico. Ambos passam pelos estádio de transformação em uma estrutura bipolar, constituída por ápice caulinar e radicular. Ambos também passam pelos estádios de desenvolvimento pró-embriônários e embriônários: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (GUERRA *et al.*, 1999).

Embora haja um grande avanço nos estudos relacionados à embriogênese somática, o controle do processo ainda não é completamente elucidado em relação a compreensão dos estímulos e condições necessárias para a dominação da fisiologia do desenvolvimento (FLOH *et al.*, 2015). Além disso, a morfogênese varia amplamente entre espécies, de forma que muitas vezes não se aplica as mesmas conclusões para diferentes organismos.

No presente projeto o estudo da ES com o Jequitibá-rosa teve seu início no

ano de 2016 no Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Genotoxicidade (BIOGEN), do Instituto de Ciências da Natureza da UNIFAL-MG, situado em Alfenas, no Sul de MG. Desde então foram elucidadas questões iniciais sobre a indução da calogênese e as melhores composições dos meios de cultura para explantes selvagens. Nessa linha já foram obtidos calos de segmentos nodais e caulinares, porém, atualmente as pesquisas são conduzidas com calos provenientes de segmentos foliares que apresentaram maiores taxas de calogênese além de potencial embriogênico (DOS SANTOS, 2016; SANDOVAL, 2019).

### 2.3 PROTOPLASTOS VEGETAIS

Toda célula vegetal possui uma parede celular responsável por sua forma, manutenção da rigidez e pela proteção contra lise osmótica. Constituída por lamela média, parede primária, e em alguns tipos celulares, parede secundária, a parede celular funciona também como filtro das células vegetais, já que permite troca de substâncias entre outras células vizinhas (CHAWLA, 2010). Essa parede possui uma estrutura química complexa que consiste em uma mistura de polissacarídeos, proteínas, compostos fenólicos e sais minerais. Além disso, a parede celular possui um caráter dinâmico e pode torna-se mais rígida ou mais flexível de acordo com a necessidade da planta (BUCKERIDGE, 2010).

Quando a parede celular é removida, através de processo físico ou enzimático, são obtidas células em formato esférico chamadas de protoplastos. Essas células nuas com a superfície celular (membrana plasmática) exposta e acessível fornece o ponto de partida a várias técnicas de manipulação genética ou de hibridação somática de células vegetais para o melhoramento das culturas (GIRI; GIRI, 2007; REZAZADEH; NIEDZ, 2015; LING *et al.*, 2010; AYELESO 2015). Isso porque a remoção da parede celular torna mais fácil a inserção de moléculas, como ácido nucleicos, no núcleo da célula. Além de se tornar mais permeável, as células desprovidas de parede podem vir a ser fundidas, possibilitando a fusão de células filogeneticamente distintas contornando as barreiras naturais de incompatibilidade sexual e possibilitando a obtenção de novas combinações genéticas, os chamados híbridos somáticos (DAVEY *et al.*, 2005; CANHOTO 2010).

O primeiro relato de isolamento de protoplastos a partir da cultura de tecidos vegetais foi em 1892 em *Allium cepa* e em *Stratiotes aloides*, utilizando métodos

mecânicos (LING *et al.*, 2010). Os processos de obtenção e isolamento de protoplastos sofreram poucas mudanças desde as primeiras referências, porém houve um grande progresso na quantidade de espécies nas quais o sistema de obtenção de protoplastos foi bem sucedido (DAVEY *et al.*, 2005; TRIPATHI, 2010).

Embora a remoção da parede celular pareça ser simples, nem sempre o processo resulta em protoplastos viáveis. O protoplasto é considerado viável quando mantém a capacidade de regenerar a parede celular, se dividir, formar colônias e, posteriormente, regenerar plantas inteiras (LIU, 2005). Essa regeneração celular demonstra um dos maiores princípios da cultura de tecidos vegetais: a totipotencialidade celular, que é a capacidade de uma única célula dar origem à milhões de outras células, tecidos, órgãos e embriões.

O processo de utilização de protoplastos inclui fases de isolamento, purificação e cultura. O isolamento pode ser feito a partir de vários órgãos da planta, porém são os explantes foliares que ao longo do tempo se demonstram mais eficientes (MUKHTAR *et al.*, 2012). Nessa etapa ocorre a quebra da parede celular através de soluções enzimáticas de alto rendimento, como celulases e pectinases (PUGA, 2019; BHOJWANI; RAZDAN 1996). Após a ação das enzimas sobre o explante, obtém-se uma solução na qual se encontra protoplastos, células rebentadas e outros tecidos não digeridos. Por isso é feita a purificação de tal solução a fim de obter apenas os protoplastos (GIRI; GIRI 2007).

Após a purificação, os protoplastos obtidos passam por uma verificação de viabilidade. A distribuição de cloroplastos na célula e a capacidade que os protoplastos possuem em edificar uma nova parede são duas formas de verificar a viabilidade dos protoplastos (TAIZ *et al.*, 2015; CANHOTO, 2010). Posteriormente, para a cultura, são utilizados meios de cultura que geralmente são semelhantes aos usados em sistemas de cultura *in vitro* como os meios MS (MURASHIGE; SKOOG 1962) e B5 (GAMBORG *et al.*, 1968), embora com alguma frequência, sejam mais ricos em vitaminas e aminoácidos aos quais se deve adicionar um estabilizador osmótico de forma a prevenir o seu rebentamento (GIRI; GIRI, 2007; KÄRKÖNEN *et al.*, 2011). Os reguladores de crescimento tais como auxinas e citocininas também fazem parte da composição dos meios de cultura de protoplastos, uma vez que são essenciais para o fornecimento de estímulos para a divisão celular e na obtenção de calos a partir dos quais ocorre a regeneração de plantas (DOVZHENKO *et al.*, 2003; CANHOTO, 2010).

## 2.4 REGULADORES DE CRESCIMENTO

O crescimento e o desenvolvimento das plantas são controlados por substâncias orgânicas naturais denominadas fitormônios, as quais são sintetizadas em pequenas concentrações e em determinadas regiões das plantas, sendo distribuídas para diferentes órgãos nos quais exercem suas funções, inibindo ou estimulando processos fisiológicos e bioquímicos vitais. Substâncias com efeitos similares ao de fitormônios podem ser sintetizadas em laboratório e são denominadas reguladores de crescimento ou fitorreguladores (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Os hormônios vegetais são divididos em cinco grupos, são eles as auxinas, giberelinas, ácido abscísico, etileno e as citocininas. Esses fitormônios, são responsáveis pelo controle de processos vitais como germinação, crescimento, desenvolvimento, floração e frutificação das plantas. Normalmente a ação dos hormônios vegetais ocorre em locais diferentes de onde foram produzidos e atuam em pequenas concentrações dentro do organismo, agindo na maioria das vezes sobre células e órgãos específicos (TAIZ; ZEIGER, 2017).

As atividades hormonais são importantes para o ciclo de vida nas plantas. A ação das auxinas por exemplo está relacionada ao crescimento vegetal, de forma que atua sobre a parede celular, provocando sua alongação ou distensão (LOSS *et al.*, 2008). Entretanto, dependendo da concentração de auxinas e do órgão vegetal, esse hormônio pode inibir o crescimento (YANG; ZHANG, 2010). Além disso, a auxina também tem ligação com a formação de frutos, queda das folhas e formação de raízes adventícias (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Os hormônios da classe das citocininas, por sua vez, promovem o crescimento vegetal através da ocorrência de mitoses, aumentando consideravelmente o número de células da planta. Além de promoverem a divisão celular, as citocininas estão relacionadas com a floração, com o desenvolvimento de gemas laterais e com o retardo da senescência (envelhecimento) da planta (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Na cultura de tecidos as citocininas são comumente usadas para iniciar o crescimento celular e também para induzir a formação de brotações, nas quais participam ativamente de vários processos fisiológicos das plantas. Isso inclui a multiplicação de brotações, produção de raízes tuberosas, indução de calos,

senescência foliar e disparar em reguladores de atividade do meristema apical (KAVIANI *et al.*, 2013; BHAT *et al.*, 2013; ABU-ROMMAN *et al.*, 2015; DESHWAL; TRIVEDI, 2011; BORJIAN; ARAK 2013, RIEFLER *et al.*, 2006; TUCKER; LAUX, 2007).

Hatanaka *et al.* (1991) estudando a embriogênese somática em explantes de *Coffea canephora*, obtiveram o número máximo de embriões em meio de cultura contendo apenas citocinina. Nesse estudo as auxinas testadas, ANA (ácido naftaleno acético), AIB (ácido indol-butírico), AIA (ácido indol acético e 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético), inibiram a formação de embriões.

O processo de ES possui algumas etapas nas quais os reguladores de crescimento exercem diferentes efeitos. As células competentes geralmente estão presentes em massas pró-embriogênicas (MPBs) que são formadas em meio suplementados com auxinas. A auxina é o fator mais importante para a indução (Etapa I), sendo conhecida a importância da presença de 2,4-D ou outras auxinas para a formação das MPEs a partir de células isoladas. Embora as auxinas sejam um fator essencial para as células apresentarem totipotência, é sabido que a sua permanência no meio após tal aquisição tem um efeito inibitório sobre a formação de embriões somáticos a partir de MPEs (Etapa II) (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990, YANG; ZHANG, 2010). Embora haja uma conformidade no uso de reguladores de crescimento, o desenvolvimento de embriões em tecidos somáticos de espécies lenhosas não seguem um padrão claro, de forma que já é relatado o surgimento dos mesmos na ausência de reguladores de crescimento e somente na presença de ácido abiscísico (CHOI *et al.*, 1998; NISHIWAKI *et al.*, 2000).

Existem ainda outros indutores envolvidos na ES utilizados para a transição de células somática para célula embriogênicas. Entre eles destacam-se a alta concentração de sacarose ou estresse osmótico e íons de metais pesados (PASTERNAK *et al.*, 2002). Baseado na grande variedade de tipos indutores, a ES não pode ser definida como resposta específica a um ou mais reguladores de crescimento aplicados e sim como efeito estressante que estes podem causar às células desencadeando os mecanismos de adaptação que levam à formação dos embriões somáticos. Entretanto, os níveis de hormônios endógenos podem ser considerados como os principais fatores na determinação da especificidade da resposta celular aos estímulos de estresse (FEHÉR *et al.*, 2003).

Por estas razões, é de grande importância a investigação da ação de

diferentes reguladores de crescimento durante o processo de ES, principalmente em espécies vegetais que ainda apresentam estudos incipientes.

## 2.5 ANÁLISE CITOQUÍMICA E ANÁLISE HISTOLÓGICA PARA ESTUDOS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Na embriogênese somática indireta é possível analisar as massas calosas através de corantes para compreender a natureza das células que as compõe. A chamada análise citoquímica utiliza os corantes carmim acético e o azul de Evans, de forma que células embriogênicas reagem fortemente ao carmim, se apresentando em coloração vermelha, enquanto que o corante azul penetra por rupturas da parede celular, característica de células que não possuem atividade embriogênicas (STEINER, 2005).

Em estudos citoquímicos o corante Carmim é utilizado para detectar glicoproteínas, cromatina e DNA, macromoléculas abundantes nas células embriogênicas (DURZAN, 1988). Neste sentido, avaliações histológicas são úteis para caracterizar a ontogenia dos embriões, verificar a origem dos mesmos, constatar a presença de embriogênese repetitiva e as possíveis causas da falta de conversão em embriões.

Esta distinção é possível pois células embriogênicas apresentam citoplasma denso são isodiamétricas e reativas ao carmim acético, resultando em coloração avermelhada. Associa-se essa reação com a competência celular para o desenvolvimento embriogênico e a integridade cromossômica (DURZAN, 1988; MUNHOZ *et al.*, 2008; STEINER *et al.*, 2008). A utilização desse método para avaliar a competência dos calos é eficiente pois é realizada de forma rápida e não demanda equipamentos complexos para a análise.

Outro método utilizado para reconhecer e caracterizar calos embriogênicos é através da histologia. O estudo da embriogênese somática através de observações histológicas tem se mostrado cada vez mais útil, abrangendo o uso de várias técnicas que permitem detalhar os eventos que ocorrem quando espécies de plantas são cultivadas *in vitro*. Dessa maneira é possível conhecer e monitorar o desenvolvimento de células e tecidos do material vegetal durante as diferentes etapas do processo de embriogênese somática, bem como identificar os tecidos e/ou células mais responsivos e/ou embriogênicos marcadores no início do processo

(GOMES *et al.*, 2017).

Na embriogênese somática indireta, a análise histológica de calos permite observar a disposição das células componentes. Dessa forma é possível compreender se o material observado é apenas um aglomerado celular desorganizado sem função embriogênica, ou se massa possui padrões de divisão celular característicos da embriogênese somática.

Em estudos histológicos é possível observar a característica das células existentes, se estas são alongadas ou redondas, se possuem vacúolo expandido, assim como a presença de matriz celular e espaços intercelulares. Quando existe um estágio avançado de desenvolvimento embrionário, é possível ainda observar elementos característicos como meristema fundamental, procâmbio, protoderme e elementos de vaso (MEIRA *et al.*, 2019). Assim como o processo de embriogênese somática em *Jequitibá-rosa* ainda é pouco conhecido, a anatomia de calos desta espécie também é inexistente na literatura.

## REFERÊNCIAS

ABU-ROMMAN, S. M.; AL-HADID, K. A.; ARABIYYAT, A. R. Kinetin is the most effective cytokinin on shoot multiplication from cucumber. **Journal of Agricultural Science**, v. 7, n. 10, p. 159-165, 2015.

ARAGÃO, V. P. M. *et al.* Storage time affects the germination and proteomic profile of seeds of *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze (Lecythidaceae), an endangered tree species native to the Brazilian Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Botany**, v. 42, n. 3, 2019.

AYELESO, Taiwo Betty. **Protoplast isolation and plant regeneration in Bambara groundnut: a platform for transient gene expression**. 2015. 121 f. Tese (Doutorado em Agricultura) - Cape Peninsula University of Technology, Cidade do Cabo, 2015.

BEVITORI, R. *et al.* Morpho-anatomical characterization of mature embryo-derived callus of rice (*Oryza sativa* L.) suitable for transformation. **Protoplasma**, n. 251, p. 545-554, 2014.

BHAT, S. V. *et al.* *In vitro* shoot organogenesis and plantlet regeneration in brinjal (*Solanum melongena* L.). **The Bioscan**, v. 8, n. 3, p. 821-823, 2013.

BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. **Plant cell tissue & organ culture: theory and practice**. Netherlands: Elsevier, 1996.

BORJIAN, L.; ARAK, H. A. Study on the effect of different concentration of plant hormones (BAP, NAA, 2, 4-D, and Kinetin) on callus induction in *Brassica napus*. **International Research Journal of Applied and Basic Sciences**, v. 5, p. 519-521, 2013.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P. **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Editora Blucher, 2010.

CANHOTO, J. M. **Biotechnology vegetal da clonagem de plantas à transformação genética**. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 2010.

CARVALHO, P. E. R. **Jequitibá-Rosa: circular técnica**. Colombo: Embrapa – SPI, 2005.

CHAWLA, H. S. **Introduction to plant biotechnology**. 3. ed. Enfield: Science Publishers, 2010.

CHIANCONE, B.; GERMANÀ, M. A. Micropropagation of Citrus spp. by organogenesis and somatic embryogenesis". *In*: LAMBARDI, M.; OZUDOGRU, E. A.; JAIN, S. M. **Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants**. New York: Springer Science, 2013.

CHOI, Y. E. *et al.* Regenerative ability of somatic single and multiple embryos from cotyledons of Korean ginseng on hormone-free medium. **Plant Cell Reports**, v. 17, n. 6, p. 544-551, 1998.

DAVEY, M.R. *et al.* Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 131-171, 2005.

DESHWAL, R. K.; TRIVEDI, P. Effect of kinetin on enhancement of tuberous root production of *Chlorophytum borivillianum*. **International Journal of Innovations in Biological and Chemical Sciences**, Jaipur, v. 1, p. 28-31, 2011.

DODEMAN, V. L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis *versus* somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 1493-1509, 1997.

DOVZHENKO, A.; KOOP, H. U. Sugarbeet (*Beta vulgaris L*): shoot regeneration from callus and callus protoplasts. **Planta**, v. 217, p. 374-381, 2003.

DOS SANTOS, Pedro Miguel Domingues. **Biometria, conservação de germoplasma e multiplicação *in vitro* de Jequitibás-rosa do Sul de Minas Gerais**. 2016. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2016.

DOVZHENKO, A.; KOOP H.U. Sugarbeet (*Beta vulgaris L*): shoot regeneration from callus and callus protoplasts. **Planta**, v. 217, p. 374-381, 2003.

DURZAN, D. J. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v. 6, n. 11, 1988.

FEHER, A. TP, P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 74, p. 201-228, 2003.

FLOH, E. L. S.; DOS SANTOS, A. L. W.; DEMARCO, D. Embriogênese vegetal: Abordagens básicas e biotecnológicas. *In*: RESENDE, R. R. **Biotecnologia aplicada à saúde**: fundamentos e aplicações. Blucher, 2015.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, O. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. **Exp Cell Res**, v. 50, p. 151-158, 1968.

GATTI, Kellen Cristina. **Propagação vegetativa de pau mulato (*Calycophyllum spruceanum* (benth) k.schum.), jequitibá (*Cariniana estrellensis* (raddi) kuntze) e teca (*Tectona grandis* linn. f.) por miniestaquia**. 2002. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008.

GIRI, C.C., GIRI A. **Plant biotechnology**: practical manual. New Delhi: I K International Publishing House, 2007.

GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Dynamics of morphological and anatomical changes in leaf tissues of an interspecific hybrid of oil palm during acquisition and development of somatic embryogenesis. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v. 131, p. 269-282, 2017.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. *In*: TORRES, A. C.; CALDAS, L. A. **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPQ, 1990.

GUAN Y. *et al.* Application of somatic embryogenesis in woody plants. **Front. Plant Sci.**, v. 7, n. 938, 2016.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. *In*: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/CBAB, 1999.

HATANAKA, T. *et al.* Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. **Plant Cell Reports**, v. 10, p. 179-182, 1991.

INSTITUTO CABRUCÁ. **Nota técnica 01/2014**. "Maior Jequitibá do Brasil". Bahia,

2013.

ISAH, T. Induction of somatic embryogenesis in woody plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 5, 2016.

IUCN (2012). **Internacional union for conservacion of nature red list threatened species**. Version 2012. Acesso em: 15 July. 2019.

KÄRKÖNEN, A. *et al.* The plant cell wall: methods and protocols. In: POPPER, Z. A. (Ed.). **Plant cell tissue & organ culture**. New York: Humana Press, 2011.

KAVIANI, B. *et al.* Effect of kinetin (Kn) and naphthalene acetic acid (NAA) on the micropropagation of *Matthiola incana* using shoot tips, and callus induction and root formation on the leaf explants. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 30, p. 4134-4139, 2013.

LEAL, J. B.; SANTOS, R. P.; GAIOTTO, F. A. Effect of selective logging on diversity and gene flow in *Cariniana legalis* sampled from a cacao agroforest system. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 1, p. 626-635, 2014.

LING A. K. *et al.* Optimization of protoplast isolation protocols from callus of *Eurycoma longifolia*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 17, p. 1778-1785, 2010.

LIU, J. Protoplast isolation and culture of woody plants. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K. (Ed.). **Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants**. Dordrecht: Springer, v. 77, p. 553-566, 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 7. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2016.

LOSS, A. *et al.* Enraizamento de estacas de *Allamanda cathartica* L. tratadas com Ácido Indol-Butírico (AIB). **Ciências Agrárias**, v. 3, n. 4, p. 313-316, 2008.

MEIRA, F. S. *et al.* Developmental pathway of somatic embryogenesis from leaf tissues of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) revealed by histological events. **Flora**, v. 250, p. 59-67, 2019.

MUKHTAR, I.; BAJWA, R.; NASIM, G. Isolation of mesophyll protoplasts from leaves

of *Dalbergia sissoo* Roxb. **J Appl Sci Environ Manage**, v. 16, p. 11-15, 2012.

MUNHOZ, M. *et al.* Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 209-214, 2008.

NAWROT-CHORABIK, K.; PIETRZYKOWSKI, M. Somatic embryogenesis of callus tissue toward protecting forest ecosystems. **J. For. Res.**, v. 30, n. 4, p. 1159-1166, 2018.

NISHIWAKI, M. *et al.* Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. **Planta**, v. 211, p. 756- 759, 2000.

OZUDOGRU, E. A. *et al.* Cryopreservation of *Fraxinus excelsior* L. Embryogenic Callus by One-Step Freezing and Slow Cooling Techniques. **CryoLetters**, v. 31, p. 63-75, 2010.

PAIS, M. S. Somatic embryogenesis induction in woody species: the future after OMICs data assessment. **Front. Plant Sci.**, v. 10, n. 140, 2019.

PASTERNAK, T. P. *et al.* The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. **Plant Physiol** n. 129, p. 1807-1819, 2002.

PILATTI, F. K. *et al.* *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. *in vitro* cellular & developmental biology. **Plant**, v. 47, p. 82-98, 2011.

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

PUGA, J. R. N. **Iniciação de culturas celulares a partir de protoplastos de tamarilho (*Solanum betaceum* Cav.)**. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia vegetal) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2019.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R. *et al.* Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, n.285, 2006.

RÊGO, G. M.; POSSAMAI, E. **Efeito do substrato e da temperatura sobre a germinação e vigor de sementes do Jequitibá-Rosa (*Cariniana legalis*)**. Comunicado técnico. Colombo: Embrapa. 2004.

REIS, J. R. M.; FONTOURA, T. Diversity of epiphytic bromeliads in the Reserva Particular do Patrimônio Natural Serra do Teimoso-Jussari, BA. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 1, p. 73-79, 2009.

REZAZADEH, R.; RANDALL, P. N. Protoplast isolation and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) using experiments in mixture-amount design. **Plant Cell Tissue & Organ Culture**, v. 122, p. 585-604, 2015.

RIEFLER, M. *et al.* *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. **The Plant Cell**, v. 18, p. 40-54, 2006.

SANDOVAL, C. A. V. **Cultivo *in vitro* de callos de Jequitibá-rosa del sur de Minas Gerais**. 2019. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais). Universidade Federal de Alfenas. Alfenas. 2019.

SANTA-CATARINA, C, *et al.* The use of somatic embryogenesis for mass clonal propagation and biochemical and physiological studies in woody plants. **Current Topics in Plant Biology**, v. 13, 2013.

SILVA-NETO, S. P.; ANDRADE, S. R. M. Cultura de tecidos vegetais: princípios e aplicações. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. de. (Org.). **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011.

SOUSA, K. R. *et al.* Polyamine, amino acid, and carbohydrate profiles during seed storage of threatened woody species of the Brazilian Atlantic Forest may be associated with seed viability maintenance. **Braz. J. Bot.**, v. 39, 2016.

STEINER, N. *et al.* Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 6, p. 895-903, 2005.

STEINER *et al.* *Araucaria angustifolia* biotechnology. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 20-28, 2008.

STEINER, N. *et al.* A gymnosperm homolog of somatic embryogenesis receptor-like kinase-1 (SERK1) is expressed during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 109, 2012.

TAIZ, L., ZEIGER, E., MOLLER, I. M., MURPHY, A. **Plant physiology and development**. 6. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TAMBARUSSI, E. V. *et al.* Paternity analysis reveals significant isolation and near neighbor pollen dispersal in small *Cariniana legalis* Mart. Kuntze populations in the Brazilian Atlantic Forest. **Ecology and Evolution**, v. 5, n. 23, p. 5588-5600, 2015.

TRIPATHI G. **Cellular and Biochemical Science**. Nova Delhi: IK International, 2010.

TUCKER, M. R.; LAUX, T. Connecting the paths in plant stem cell regulation. **Trends in Cell Biology**, v. 17, n. 8, p. 403-410, 2007.

VON ARNOLD, S. *et al.* Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant cell, tissue and organ culture**. v. 69, 2002.

WOLFART, M. R. **Calos de passifloras silvestres: indução, caracterização morfo-histológica, metabólica e ultraestrutural**. 2015. 119 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos, Algas e Plantas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

YANG, X.; ZHANG, X. Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v. 29, p. 36-57, 2010.

## ARTIGO 1 - POTÊNÇAL EMBRIOGÊNICO DE CALOS DE JEQUITIBÁ-ROSA CULTIVADOS NA PRESENÇA DE CITOCININAS

### Resumo

O Jequitibá-rosa (*Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze) é uma espécie fornecedora de madeira de grande valor econômico, e que também desempenha importante papel ecológico em seu habitat, atualmente se encontra ameaçada e com poucos indivíduos na natureza. Por possuir limitações em sua propagação natural, faz-se necessário o aprimoramento de métodos de propagação vegetativa como a embriogênese somática. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito de diferentes concentrações de citocininas na indução de embriões somáticos em calos de Jequitibá-rosa. Calos induzidos através de explantes foliares com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP, após oito meses de cultivo foram privados de auxinas e passaram a ser cultivados em meios suplementados apenas com citocininas. Os tratamentos utilizaram 6-benziloaminopurina (BAP) e a Cinetina (KIN) nas seguintes concentrações: T0: 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN; T1: 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3,0 mg L<sup>-1</sup> KIN; T2: 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3,5 mg L<sup>-1</sup> KIN; T3: 10,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN; T4: 10,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3,0 mg L<sup>-1</sup> KIN; T5: 10,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3,5 mg L<sup>-1</sup> KIN; T6: 12,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3,0 mg L<sup>-1</sup> KIN. Os calos foram submetidos a análise citoquímica com os corantes azul de Evans e carmim acético. Os tratamentos que apresentaram os melhores resultados para a presença de células embriogênicas foram T0 MC e ME: 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN, T3 (ME): 10,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN e T4 (B): 10,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3,0 mg L<sup>-1</sup> KIN. Esses quatro tratamentos foram então submetidos a análise histológica para observação mais detalhada. Os resultados demonstraram que não havia a presença de estruturas relacionadas à embriogênese somáticos nos tratamentos observados, porém foi identificada a presença de Matriz extracelular.

**Palavras-chave:** Embriogênese somática. Cultura de tecidos. Histologia de calos.

### Abstract

Jequitibá-rosa (*Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze) is a wood supplier of great economic value, which also plays an important ecological role in its habitat, is

currently threatened and with few individuals in the wild. As it has limitations in its natural propagation, it is necessary to improve vegetative propagation methods such as somatic embryogenesis. The aim of this study was to verify the effect of different concentrations of cytokinins on the induction of somatic embryos in calluses of Jequitibá-rosa. Calli induced by leaf explants with 0.1 mg L<sup>-1</sup> of ANA and 1.0 mg L<sup>-1</sup> BAP, after eight months of cultivation were deprived of auxins and started to be cultivated in media supplemented with cytokinins only. The treatments used 6-benzylaminopurine (BAP) and Kinetin (KIN) in the following concentrations: T0: 0.0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0.0 mg L<sup>-1</sup> KIN; T1: 0.0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3.0 mg L<sup>-1</sup> KIN; T2: 0.0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3.5 mg L<sup>-1</sup> KIN; T3: 10.0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0.0 mg L<sup>-1</sup> KIN; T4: 10.0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3.0 mg L<sup>-1</sup> KIN; T5: 10.0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3.5 mg L<sup>-1</sup> KIN; T6: 12.0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3.0 mg L<sup>-1</sup> KIN. The calluses were subjected to cytochemical analysis with Evans blue and acetic carmine dyes. The treatments that showed the best results for the presence of embryogenic cells were T0 MC and ME: 0.0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0.0 mg L<sup>-1</sup> KIN, T3 (ME): 10.0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0.0 mg L<sup>-1</sup> KIN and T4 (B): 10.0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3.0 mg L<sup>-1</sup> KIN. These four treatments were then submitted to histological analysis for more detailed observation. The results showed that there were no structures related to somatic embryogenesis in the treatments observed, but the presence of an extracellular matrix was identified.

**Keywords:** Somatic embryogenesis. Tissue culture. Callus histology.

## 1 INTRODUÇÃO

*Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze é conhecida como uma das maiores árvores da Flora Nacional, e que além de se destacar por seu papel ecológico *in natura*, é também fornecedora de madeira de alto valor (RÊGO; POSSAMAI, 2004). Atualmente a espécie possui uma baixa densidade populacional na natureza, com menos de 1 indivíduo por ha (TAMBARUSSI et al., 2015). Segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) a *C. legalis* se encontra classificada na categoria vulnerável (IUCN, 2016). O quadro de conservação da espécie se agrava com fatores adicionais como a exploração intensiva de madeira e perda acelerada de habita.

A reprodução do Jequitibá-rosa enfrenta dificuldades como a dispersão reduzida de pólen e sementes devido à fragmentação do habitat, de forma que os poucos indivíduos na natureza produzindo cada vez menos frutos (LEAL *et al.*, 2014). A coleta de sementes de indivíduos adultos para plantio direto também se configura como um problema, pois possuir uma altura que podem chegar a 50 metros, só é possível ter acesso a copa através de técnicas de escalada. Uma vez coletadas as sementes do Jequitibá-rosa também não possuem um boa durabilidade. Estudos de Aragão *et al.* 2019 demonstraram que as sementes desta espécie sofrem perdas significativas de viabilidade a partir de seis meses de armazenamento (ARAGÃO *et al.*, 2019).

Diante desse quadro torna-se eminente a necessidade de traçar estratégias eficientes para a manutenção da espécie. A cultura de tecidos, em especial as técnicas envolvidas na embriogênese somática, representa uma alternativa viável para a propagação vegetativa do Jequitibá-rosa. A embriogênese somática é um processo que se assemelha à embriogênese zigótica, porém, se desenvolve a partir de células somáticas, sem a ocorrência da fusão de gametas. Em condições *in vitro*, os embriões somáticos desenvolvem-se por meio de estágios similares aos observados na embriogênese zigótica, exceto pelo fato de que os embriões somáticos não se tornam dormentes e não são revestidos pelos integumentos e endosperma (DODEMAN *et al.*, 1997).

Durante o processo de embriogênese somática, reguladores de crescimento são necessários para desdiferenciação durante a formação de calos e diferenciação para formação de embriões somáticos. Sucesso na obtenção de embriões na fase de diferenciação através de calos cultivados na presença de citocinas isoladas já foi relatado para espécies vegetais (SONDAHL *et al.*, 1979; AYUB; GIBIELUCA, 2003; FOO *et al.*, 2018.).

Nesse contexto, para o sucesso na embriogênese somática indireta, a identificação e caracterização de calos com potencial embriogênico é de fundamental importância. Os calos podem ser caracterizados quanto aos aspectos morfológicos e citológicos por meio de análises citoquímicas de acordo com o protocolo de historesina modificado. Esta técnica permite que os calos embriogênicos sejam distinguidos dos calos não embriogênicos, e permite uma maior compreensão do desenvolvimento celular e da morfogênese.

Células isodiamétricas pequenas com núcleos grandes e nucléolos

proeminentes, mitocôndrias, citoplasma com pouco espaço intercelular e um sistema celular organizado em células com potencial embriogênico podem ser visualizados através da coloração com azul de toluidina através de cortes histológicos. Os calos não embriogênicos possuem, em sua maioria, células grandes, alongadas e vacuoladas, com espaços intercelulares e sistema celular desorganizado, e são inviáveis (PÁDUA *et al.*, 2013; GOMES *et al.*, 2016).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de reguladores de crescimento da classe de citocininas na embriogênese indireta utilizando explantes foliares de Jequitibá-rosa.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Biotecnologia Ambiental e Genotoxicidade (BIOGEN), do Instituto de Ciências da Natureza, e no laboratório de Histologia do departamento de Ciências Biomédicas, ambos da UNIFAL-MG situados em Alfenas, no Sul do Estado de Minas Gerais, nos anos de 2018 e 2019.

### 2.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal utilizado para indução de calos foi obtido de clones de Jequitibá-rosa com 2 anos de idade. Os referidos clones encontram-se no Campus Santa Clara da Universidade Federal de Alfenas-MG (coordenadas: 21 ° 25 'S e 45 ° 58' W). As folhas foram lavadas com água e sabão líquido comercial para desinfestação. Em seguida, na câmara de fluxo laminar, foram colocados em solução de etanol 70% por 2 minutos para então serem imersos em hipoclorito de sódio 2,5% com 5 gotas de Tween® 20 por 10 minutos sob agitação constante. Por fim, foram lavados 3 vezes com água destilada estéril (Rocha *et al.*, 2007).

### 2.2 INDUÇÃO DOS CALOS

A formação de calos foi induzida pela inoculação de folhas jovens de 1 cm<sup>2</sup> com a face abaxial colocada em tubos de ensaio contendo WPM com micronutrientes e macronutrientes diluídos no meio MS acrescido com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de

ANA e  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP.

Após sete meses os calos foram transferidos para vidros de 250 ml, nos quais foram acrescentados 50 ml de solução contendo meio WPM meia força suplementado com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $0,4 \text{ g L}^{-1}$  do antioxidante PVP, solidificado com  $7 \text{ g L}^{-1}$  de ágar. O pH do meio foi justado para  $\pm 5,8$  antes da autoclavagem a  $120^\circ\text{C}$  por 20 minutos. Nessa etapa os calos foram privados de auxinas e passaram a ser cultivados apenas na presença de citocininas. Os tratamentos foram realizados com 6-benziloaminopurina (BAP) e Cinetina (KIN) nas seguintes concentrações: T0:  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  KIN; T1:  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  KIN; T2:  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $3,5 \text{ mg L}^{-1}$  KIN; T3:  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  KIN; T4:  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  KIN; T5:  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $3,5 \text{ mg L}^{-1}$  KIN; T6:  $12,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  KIN. Os calos foram mantidos então por 10 meses sendo cultivados em meios contendo citocininas.

### 2.3 ANÁLISE CITOQUÍMICA

A formação de calos foi induzida pela inoculação de folhas jovens de  $1 \text{ cm}^2$  com a face abaxial colocada em tubos de ensaio contendo WPM com micronutrientes e macronutrientes diluídos no meio MS acrescido com  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA e  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP.

Após sete meses os calos foram transferidos para vidros de 250 ml, nos quais foram acrescentados 50 ml de solução contendo meio WPM meia força suplementado com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $0,4 \text{ g L}^{-1}$  do antioxidante PVP, solidificado com  $7 \text{ g L}^{-1}$  de ágar. O pH do meio foi justado para  $\pm 5,8$  antes da autoclavagem a  $120^\circ\text{C}$  por 20 minutos. Nessa etapa os calos foram privados de auxinas e passaram a ser cultivados apenas na presença de citocininas. Os tratamentos foram realizados com 6-benziloaminopurina (BAP) e Cinetina (KIN) nas seguintes concentrações: T0:  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  KIN; T1:  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  KIN; T2:  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $3,5 \text{ mg L}^{-1}$  KIN; T3:  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  KIN; T4:  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  KIN; T5:  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $3,5 \text{ mg L}^{-1}$  KIN; T6:  $12,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  KIN. Os calos foram mantidos então por 10 meses sendo cultivados em meios contendo citocininas.

Quadro 1 - Pontuação utilizada para a contagem de presença de células/estruturas reativas ao carmim acético na análise citoquímica. \*presença de células vermelhas em determinado loco da lâmina analisada.

Nota	Porcentagem de material embriogênico observado
0	0
I	1% a 25% de cobertura*
II	25% a 50% de cobertura
III	De 50% a 75% de cobertura
IV	De 75% a 100% de cobertura

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

## 2.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os melhores tratamentos revelados na análise citoquímica foram submetidos a análises histológicas. Para as análise histológica, amostras de calos foram fixadas em FAA (Formaldeído 37% e etanol 70%) por um período de 24 horas. Após a fixação as amostras foram desidratadas em uma série etanólica crescente (70%, 95% e 100%) por uma hora em cada uma. Após a desidratação as amostras passaram pela infiltração. Para tal, as amostras foram mergulhadas em álcool 100% + resina com ativador, após um período de 24 horas as amostras foram incluídas em resina pura com ativador por mais 24 horas e depois por 12 horas imersa em resina pura. Depois da infiltração seguiu-se o emblocamento das amostras em resina histológica de metacrilato. Os cortes foram realizados em micrótomo semiautomático (Leica®, RM212RT) em seções de 5 µm que foram distendidas sobre lâminas contendo água, em chapa aquecedora (42 °C). Em seguida, as lâminas foram coradas com azul de toluidina em tampão fosfato 0,2M a pH 6,8 (O'Brien *et al.*, 1964) para caracterização histológica. As lâminas foram então analisadas em microscópio óptico (Leica® DM750) o qual estava acoplado à câmera digital e computador com o software image capture (LAS EZ 2.0), utilizada para fotografar os cortes.

As análises estatísticas foram realizadas em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico R (R Core Team 2014).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

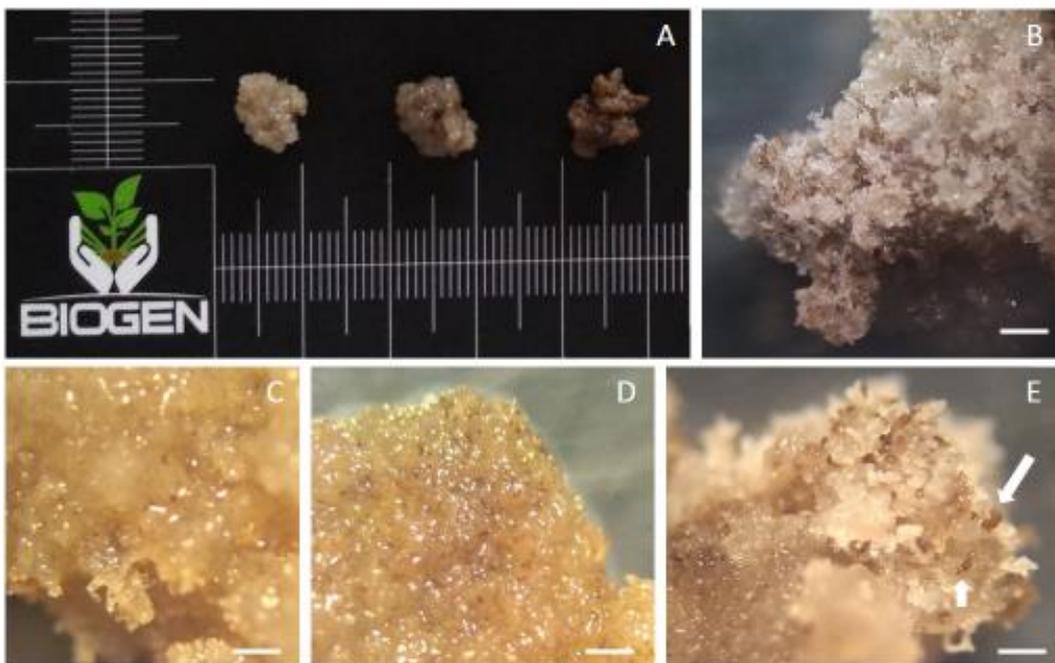
A primeira forma de classificação dos calos foi pela coloração e aspecto. Os calos nas cores branco (B) e marrom escuro (ME) apareceram apenas em dois tratamentos, diferente dos calos marrom claro (MC) que apareceram em todos (QUADRO 2). Apesar da coloração distinta, todos possuíam aspecto bastante aquoso, sendo que os calos de cor branca se apresentaram mais friáveis enquanto os de coloração marrom claro e marrom escuro possuíam aspecto mais compacto (FIGURA 1). Foram considerados friáveis os calos que apresentaram aglomerados celulares que facilmente se destacavam ao toque da pinça. Durante a análise visual foi possível observar a presença de células longas de coloração marrom (Figura 1E) que se destacavam das demais, sendo mais abundantes em calos ME, embora tenha sido observada em todos os tratamentos.

Quadro 2 - Relação da ocorrência das colorações dos calos de acordo com os tratamentos. (P) = presença, (-) = ausência

Tratamento	Fitohormônios		Coloração dos calos		
	BAP	KIN	B	MC	ME
T0	0,0	0,0	-	P	P
T1	0,0	3,0	-	P	-
T2	0,0	3,5	-	P	P
T3	10	0,0	-	P	P
T4	10	3,0	P	P	-
T5	10	3,5	P	P	-
T6	12	3,0	-	P	-

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Figura 1 - Calos de Jequitibá-rosa cultivados na presença de citocininas.  
Análise visual quanto à coloração e aspecto.



Fonte: A Autora (ano 2019).

Legenda: a) diferença entre as colorações dos calos. Da esquerda para a direita: branco (B), marrom claro (MC) e marrom escuro (ME). B- calo branco de aspecto friável.

b) calo branco de aspecto friável (Barra: 2mm).

c) calo marrom claro com detalhe das células sobressaindo nas bordas extremidades (Barra: 1mm).

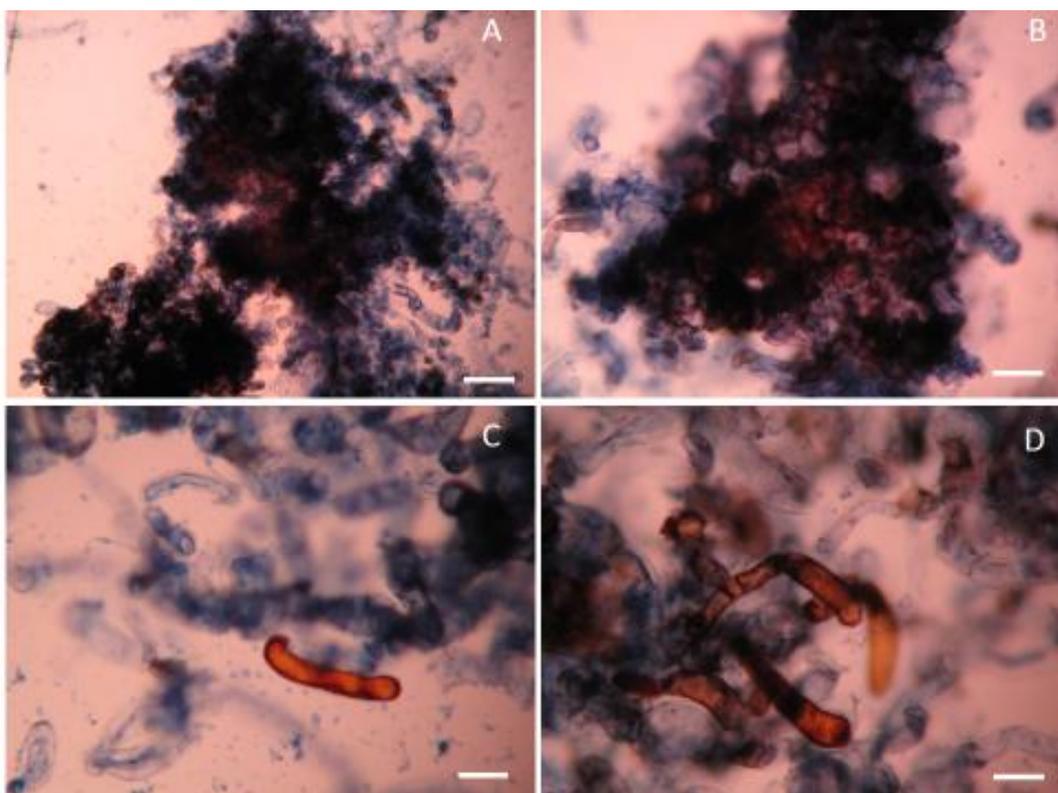
d) calo marrom claro com aspecto aquoso e células pigmentadas aparentes em seu interior (Barra: 2mm).

e) detalhe de extremidade de um calo marrom escuro com células pigmentadas se destacando (setas) (Barra: 1mm).

A análise citoquímica confirmou que parte dos calos possuíam reação positiva ao carmim acético. As regiões reativas ao carmim se manifestaram em forma de aglomerados celulares (Figura 2A e 2B). Em nenhum tratamento foi observado a presença de células isoladas, redondas, isodiamétricas, que potencialmente pudessem ser consideradas embriogênicas. Além dos aglomerados celulares houve a presença de um segundo tipo celular que apresentou uma afinidade parcial pelo corante, sendo uma células de coloração laranja (Figura 2C e D). Essas células, de maneira geral, possuíam o formato alongado e foram visualizadas em maior

quantidade nos calos de coloração marrom escuro, seguidos dos calos marrom claro e branco. O terceiro tipo celular observado foi o de células coradas pelo azul de Evans, que em sua maioria apareceu em formato alongado. A afinidade por esse corante normalmente indica morte celular.

Figura 2 - Análise citoquímica realizada com carmim acético e azul de Evans em calos de Jequitibá-rosa cultivados sob diferentes concentrações de BAP e KIN.



Fonte: A Autora (2019).

Legenda: a) micrografia de um aglomerado celular presente no tratamento T0 MC (ausência de reguladores de crescimento) (Barra: 200 $\mu$ m).

b) micrografia de um aglomerado celular presente no tratamento T2 MC (3,5 mg de KIN) (Barra: 200 $\mu$ m).

c e d) Células alongadas com afinidade parcial ao corante carmim acético com coloração laranja. Ambas micrografias retiradas do tratamento T0 ME (ausência de reguladores de crescimento) (Barra: 100 $\mu$ m).

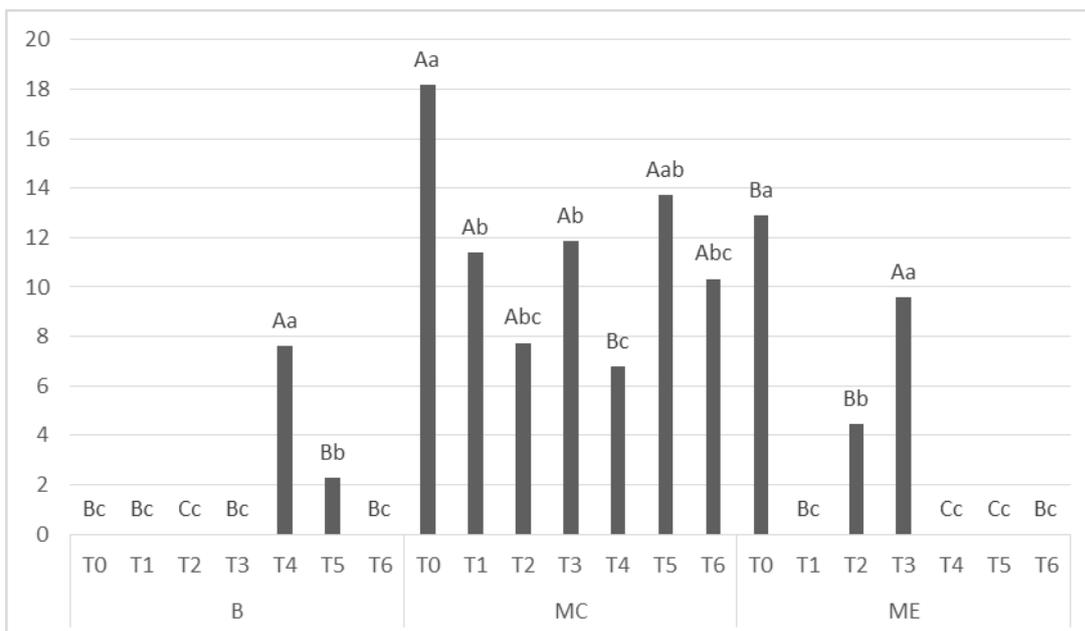
Foi observado que a coloração escura dos calos pode ser atribuída à presença desse tipo celular que apresentou afinidade parcial pelo carmim acético. Em calos ME essas células foram observadas em abundância enquanto que na

coloração B apareceram em menor quantidade. Tais tipos de células, em espécies onde já existe maior compreensão de todo processo de ES, são consideradas células calosas ou não-embriogênicas, como na *Araucaria angustifolia*, o pinheiro brasileiro (FLOH *et al.*, 2015).

Embora alguns estudos caracterizam os calos embriogênicos pela coloração, é errado afirmar que todas as espécies seguem o mesmo espectro de cor para sinalizar atividade embriogênica. Para Singh *et al.*, 2005, aspectos translúcido-brancos ou amarelados dos calos são considerados com potencial para formarem embriões somáticos. Enquanto que para Nawrot-Chorabik, o calo considerado embriogênico é transparente a uma cor entre branco e creme-palha, com uma consistência é macia e hidratada, e a estrutura é glutinosa, solta e homogênea. E o calo não embriogênico é transparente ou amarelo a verde, firme e seco, denso e compacto, com superfície rugosa a nodular (Nawrot-Chorabik 2015).

Em relação à concentração dos reguladores de crescimento, a análise de variância mostrou que os tratamento T0 MC, T0 ME, T3 ME, T4 B foram aqueles que apresentaram melhores resultados em relação à presença de MPE (FIGURA 3), ou seja, foram aqueles que obtiveram uma variação significativa ( $P < 0,05$ ) entre as concentrações. A presença de afinidade pelo corante carmim está associada à competência para o desenvolvimento celular (STEINER *et al.*, 2008).

Figura 3 - Resultado da análise de variância realizada para avaliar o potencial embriogênico de calos cultivados sob diferentes concentrações de citocininas. No eixo horizontal dispõem-se os sete tratamentos divididos pelas colorações branco (B), marrom claro (MC) e marrom escuro (ME). No eixo vertical estão dispostos os valores em porcentagem de presença de MPE. As letras maiúsculas representam a média dos calos (cores) dentro dos tratamentos. As letras minúsculas representam as médias dos tratamentos (concentrações) dentro das cores. Os tratamentos que apresentaram a letra minúscula "a" foram aqueles que apresentaram os melhores resultados ( $p < 0,05$ ) entre as concentrações testadas, sendo então os mais significativos. Letras minúsculas que aparecem juntas demonstram que não houve diferença.

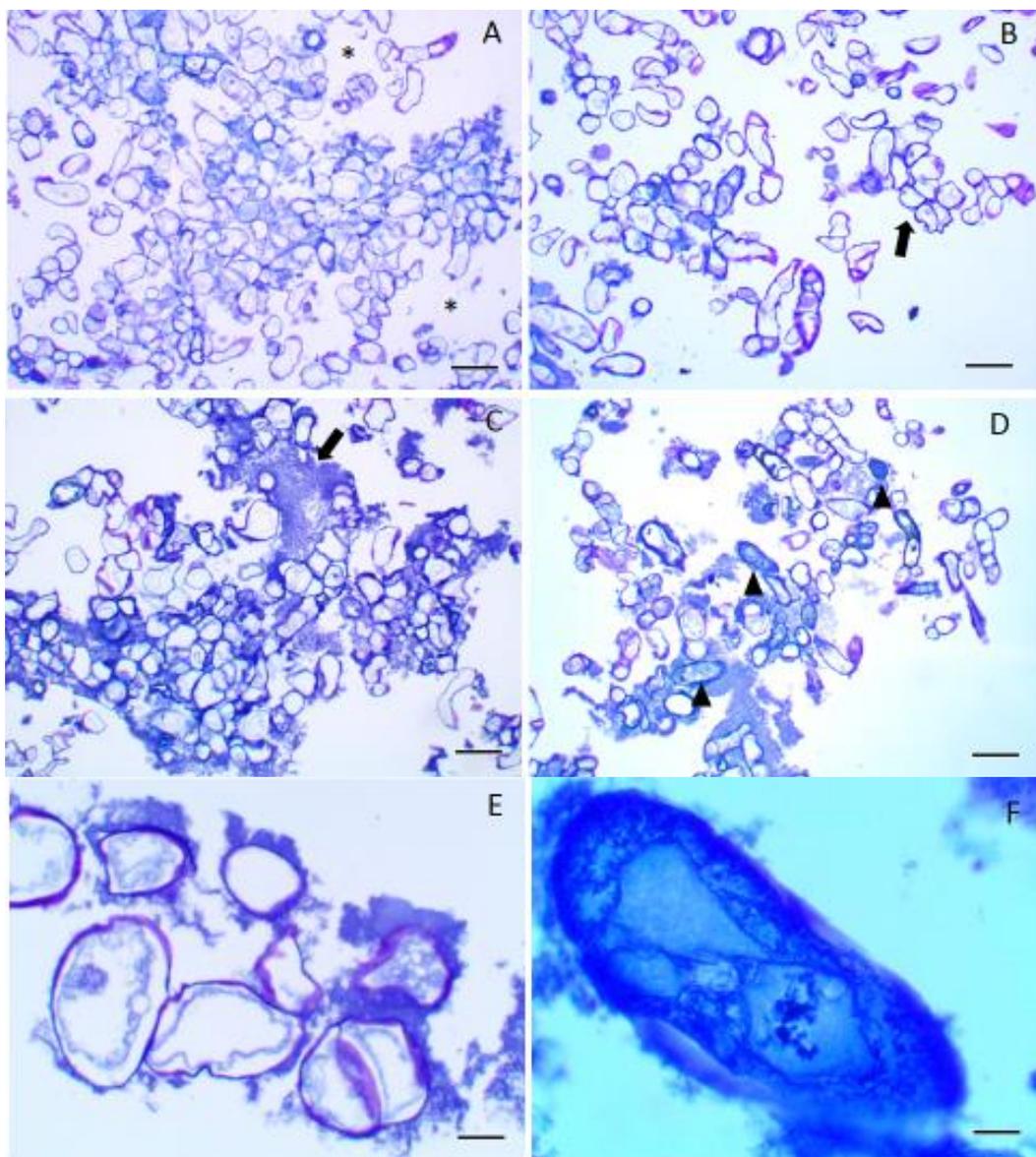


Fonte: A Autora (2019).

Os quatro tratamentos submetidos à análises histológicas mostraram que quando cultivados na ausência de citocininas (T0) os calos apresentam tecido pouco homogêneo, com a presença de muitos espaços intercelulares, porém sem linhas de ruptura associadas a tais espaços (Figura 4A e 4B). As células componentes não apresentaram nenhum padrão organizacional ou morfológico. De maneira geral, os dois formatos celulares abundantes foram redondo e alongado. Poucas células apresentaram uma relação positiva entre densidade citoplasmática e diâmetro. As características mais observadas foram lúmen amplo, parede delgada e nucléolos conspícuos. Em relação às divisões celulares, não observou-se nenhum padrão que indicasse uma direção de divisão celular.

O tratamento T0 de coloração ME apresentou as mesmas características da coloração MC (Figura 4C e 4D). A característica diferencial desse tratamento foi a maior ocorrência de células secretoras, sendo que as mesmas, por ser em sua grande maioria de formato alongado, não se encaixa como células embriogênicas. A imagem 4F mostra o vacúolo de uma célula com conteúdo interno não identificado. Outra característica de destaque dos calos ME foi a presença de regiões circundantes celulares que inicialmente foram identificadas como substâncias relacionadas ao metabolismo secundário da espécie.

Figura 4 - Micrografias representativas (Microscópio óptica) de cortes histológicos de calos de Jequitibá-rosa cultivados na ausência de reguladores de crescimento (T0).



Fonte: A Autora (2019).

Legenda: a) calos ME (\* espaços intercelulares) (Barra:  $100\mu\text{m}$ ).

b) Calos ME (seta) paredes delgadas (Barra:  $100\mu\text{m}$ ).

c) Calos ME (seta) conteúdo secretor (Barra:  $100\mu\text{m}$ ).

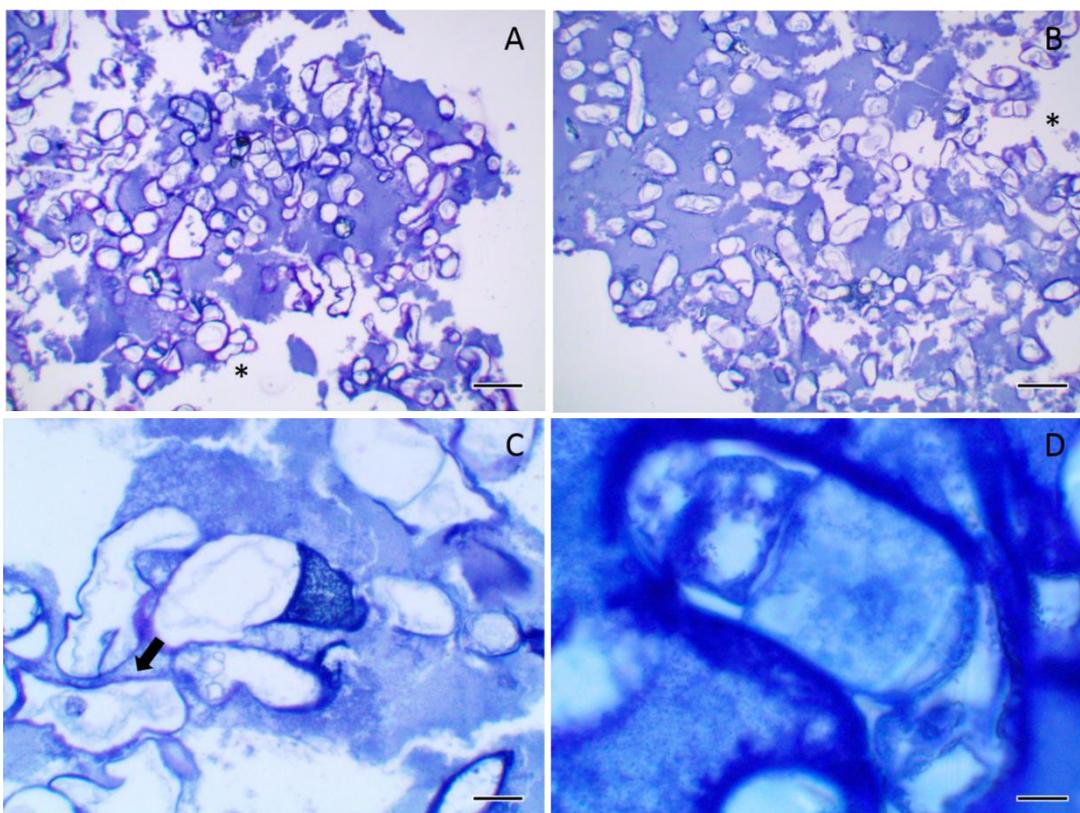
d) Calos ME (seta) células com conteúdo interno não identificado (Barra:  $100\mu\text{m}$ ).

e) Calos ME - Células com substância secretora ao seu redor (Barra:  $20\mu\text{m}$ ).

f) Calos ME - Célula com vacúolo aparente com substância não identificada em seu interior (Barra:  $10\mu\text{m}$ ).

Os calos que foram cultivados com 10 mg de BAP ME (T3) apresentaram os mesmos tipos celulares descritos anteriormente (Figura 5). Esse tratamento, semelhante ao T0 ME, apresentou em grande quantidade regiões com grande ocorrência de secreção.

Figura 5 - Micrografias representativas (Microscópio óptico) de cortes histológicos de calos de Jequitibá-rosa cultivados com  $10\text{mg L}^{-1}$  de BAP - T3 ME.



Fonte: A Autora (2019).

Legenda: a) visão geral das células calosas com abundância de substância secretora, (\*) espaços intercelulares.

b) visão geral das células calosas com abundância de substância secretora, (\*) espaços intercelulares (Barra:  $100\mu\text{m}$ ).

c) Células irregulares, com paredes bem coradas e nucléolo proeminente (Barra:  $20\mu\text{m}$ ).

d) Célula calosa com vacúolo proeminente (Barra:  $10\mu\text{m}$ ).

As células dos calos cultivados sob  $10\text{mg L}^{-1}$  de BAP e  $3\text{mg L}^{-1}$  de KIN (T4) apresentaram uma baixa afinidade pelo corante azul de Toluidina. Semelhante aos

tratamentos anteriores, foram observadas células com lúmen amplo na forma redonda e alongada, além de algumas poucas com conteúdo interno visível. Esse tratamento apresentou características como ausência da substância de secreção. Além disso, foi o tratamento que apresentou maior número de células em divisão celular, embora estas não estivessem dispostas em um única direção.

Os calos de *C. legalis* produzidos a partir de segmentos foliares cultivados na presença de citocininas não mostraram características de calos embriogênicos, sendo formados em grande parte por células com características mais alongadas, espaços intercelulares e não apresentaram características potenciais para a formação de projeções globulares. O alongamento celular é característico de células inviáveis para embriogênese somática (NOGUEIRA *et al.*, 2007). No entanto, Werner *et al.* 2010 encontraram compostos fenólicos em células alongadas de calos não embriogênicos de *Caesalpinia echinata*. Em células alongadas de calos de *Coffea arabica* Pádua *et al.* 2014 encontraram grandes vesículas e vacúolos autofágicos ocupando todo o espaço citoplasmático, enquanto outras organelas estavam ausentes. Assim, a estrutura celular dos calos induzidos a partir destes tipos de explantes de *C. legalis* pode indicar que as células alongadas observadas são inviáveis para a embriogênese somática, porém, podem ser eficientes para estudos sobre o armazenamento de metabólitos secundários.

Embora não tenha sido identificado organização celular referente à embriogênese somática, a análise histológica revelou que os calos de *C. legalis* apresentaram regiões envolvidas por matriz extracelular (ME). Esta estrutura também foi observada por outros autores (SAMAJ *et al.*, 1995; VERDEIL *et al.*, 2001; KONIECZBY *et al.*, 2005; POPIELARSKA-KONIECZNA *et al.*, 2010; BEVITORE *et al.*, 2014). Infere-se que as regiões e paredes fortemente coradas pelo azul de toluidina seja relacionado à ME pois este é um corante metacromático que exibe coloração diferente de acordo com o substrato que reage. Mucilagens e paredes ricas em pectinas coram de roxo; paredes celulósicas coram de azul, e paredes lignificadas e fenólicos não estruturais coram de verde (VENTRELLA *et al.*, 2013).

A natureza química da ME em culturas *in vitro* ainda não é totalmente conhecida, porém os principais componentes são proteínas (SAMAJ *et al.*, 1995) e substâncias pécticas, identificadas tanto por Verdeil *et al.* (2001) como neste estudo, sugerindo que a ME é formada por substâncias derivadas da degeneração da lamela média, indicando um defeito na adesão celular. Esta ME também pode ser do tipo

membranosa ou fibrilar, como observado por Bevitore *et al.* (2014), apesar de sua natureza química permanecer a mesma. Popielarska-Konieczna *et al.* (2010) indicaram que a função da ME na cultura de tecidos é participar da recepção e transdução de sinais, auxiliando no reconhecimento e determinação do destino da célula.

Blehová *et al.*, (2010), afirmam que a matriz está presente durante os processos de embriogênese somática. O não aparecimento de estruturas embriogênicas nos calos analisados no presente estudo podem estar atrelados a quantidade de material utilizado ou até mesmo no preparo das amostras que pode ter degradado e desestruturado a organização celular. As condições de laboratório para manter as culturas de calos diferem de espécie para espécie e precisam ser elaboradas em cada caso individual (EFFERTH, 2019).

Calos cultivados na presença de  $10\text{mg L}^{-1}$  de BAP foram os que apresentaram maior quantidade de ME enquanto que os calos cultivados com  $10\text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $3\text{ mg L}^{-1}$  de KIN foram os que apresentaram menores quantidade de ME e paredes celulares menos coradas. Esse resultado indica que a Cinetina combinada com BAP pode interferir negativamente na produção de ME. Em caso afirmativo entre a relação da ME e a embriogênese somática, fica claro a ação negativa da cinetina em calos de *C. legalis* na produção de embriões. Embora esse estudo não tenha revelado estruturas referentes à embriogênese somática é de extrema importância que outros estudos com a espécie sejam conduzidos para a compreensão de sua ES.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As análises demonstraram que calos de Jequitibá-rosa cultivados na presença de citocininas (BAP e KIN) não apresentaram estruturas referentes à embriogênese somática.

Calos de Jequitibá-rosa cultivados na ausência de citocininas e com  $10\text{mg L}^{-1}$  de BAP foram induzidos a produzir matriz extracelular em grande quantidade. Uma vez que este fator está relacionado com a embriogênese somática, faz-se necessário estudos mais aprofundados.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG), à CAPES, à FAPEMIG e Becas OEA-GCUB.

## REFERÊNCIAS

AYUB, R. A.; GEBIELUCA, A. N. Embriogenese somática em genótipos de café (coffea arabica) é citocinina dependente. **Publ. UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng.**, Ponta Grossa, v. 9, n. 2, p. 25-30, 2003.

BEVITORE, R.; POPIELARSKA-KONIECZNA, M.; SANTOS, E. M.; GROSSI-DE-SÁ, M. E.; PETROFEZA, S. Morpho-anatomical characterization of mature embryo-derived callus of rice (*Oryza sativa* L.) suitable for transformation. **Protoplasma**, n. 251, p. 545-554, 2014.

BLEHOVÁ, A.; BOBÁK, M.; SAMAJ, J.; HLINKOVÁ, E. Changes in the formation of an extracellular matrix surface network during early stages of indirect somatic embryogenesis in *Drosera spathulata*. **Acta Botanica Hungarica**, n. 52, p. 23-33, 2010.

CALDAS, L. S.; HARADASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C. e CALDAS, L. S. (ed). **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTB/ EMBRAPA-CNPH, 433, 1990.

DODEMAN, V. L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis *versus* somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany** n. 48, p. 1493-1509, 1997.

EFFERTH, T. Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. **Engineering**, v. 5, p. 50-59, 2019.

FLOH, E. L. S.; DOS SANTOS, A. L. W.; DEMARCO, D. Embriogênese vegetal: abordagens básicas e biotecnológicas. In: **Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações**. Blucher, 1. Ed., 2015.

FOO, P. C.; LEE, Z. H.; CHIN, C. K.; SUBRAMANIAM, S.; CHEW, B. L. Shoot Induction in White Eggplant (*Solanum melongena* L. Cv. *Bulat Putih*) using 6-Benzylaminopurine and Kinetin. **Tropical Life Sciences Research**, v. 29, n. 2, p. 119-129, 2018.

GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; BALZON, T. A.; SCHERWINSKI PEREIRA, J. E. Regeneration of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis*) using temporary immersion bioreactors. **Industrial Crops and Products**, v.89, p. 244 - 249. 2016.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Apostila de biotecnologia**. Florianópolis: UFSC/CCA, 2006.

HATANAKA, T.; CHOI, Y.E.; KUSANO, T.; SANO, H. Transgenic plants of *Coffea canephora* from embryogenic callus via Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation. **Plant Cell Reports**, v. 19, p.106-110, 1999.

IUCN (2019). **Internacional Union for Conservacion of Nature Red List Threatened Species**. Version 2012. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 15 Jul. 2019.

KONIECZNY, R.; BOHDANOWICZ, J.; CZAPLICKI, A. Z.; PRZYWARA, L. Extracellular matrix surface network during plant regeneration in wheat anther culture. **Plant Cell Tissue Org Cult**, n. 83, p. 201-208, 2005.

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

NAWROT-CHORABIK, K. The effect of explant origin, media and growth regulators on the initiation and proliferation of embryogenic callus of *Pinus sylvestris* in somatic embryogenesis. **Phyton-Ann Rei Bot**. v. 55, p. 279-295, 2015

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; PORTO, J. M. P.; NICIOLI, P. M.; STEIN, V. C.; DEUNER, S.; ALVES, E. Análise ultra-estrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Biociências**, n. 5, p. 48-50, 2007.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, n. 59, p. 368-373, 1964.

PÁDUA MP, PAIVA LV, LABORY CRG, ALVES E, STEIN VC. Induction and characterization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) pro-embryogenic masses. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.85, n. 4, p. 1545-56, 2013.

PÁDUA, M. S.; PAIVA, L. V.; SILVA, L. C.; LIVRAMENTO, K. G.; ALVES, E. CASTRO,

A. H. F. Morphological characteristics and cell viability of coffee plants calli. **Ciência Rural**, n. 44, p. 660-665, 2014.

POPIELARSKA-KONIECZNA, M.; BOHDANOWICZ, J.; STARNAWSKA, E. Extra-cellular matrix of plant callus tissue visualized by ESEM and SEM. **Protoplasma**, n. 247, p. 121-125, 2010.

R CORE TEAM (2014). R: **A language and environment for statistical computing**. R foudantion for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2014.

ROCHA, S. C.; DA, QUORIM, M.; RIBAS, L. L. F.; KOEHLER, H. S. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**, n. 31, v. 1, p. 43-50. 2007.

RÊGO, G. M.; POSSAMAI, E. **Efeito do Substrato e da Temperatura Sobre a Germinação e Vigor de Sementes do Jequitibá-Rosa (*Cariniana legalis*)**. Comunicado técnico. Colombo, PR: Embrapa. 2004.

SAMAJ, M. B.; BOBAK, M.; BLEHOVA, A.; KRISTIN, J.; AUXTOVÁ-SAMAJOVÁ, O. Developmental SEM observations on an extracellular matrix in embryogenic calli of *Drosera rotundifolia* and *Zea mays*. **Protoplasma**, n. 186, p. 45-49, 1995.

SINGH, R.; RAI, M. K. & KUMARI, N. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Sapindus mukorossi* Gaertn. from leaf-derived callus induced with 6-benzylaminopurine. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 177, n. 2, p. 498-510, 2015.

SONDAHL, M. R.; SALISBURY, J. I.; SHARP, W. R. S. Characterization of embryogenic tissue and globular embryos during high frequency somatic embryogenesis in Coffee callus cells. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, v. 94, p. 185-188, 1979.

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**, v.48, n.6, p.895-903, 2005.

TAMBARUSSI, E. V. et al. Paternity analysis reveals significant isolation and near neighbor pollen dispersal in small *Cariniana legalis* Mart. Kuntze populations in the Brazilian Atlantic Forest. **Ecology and Evolution**, v. 5, n. 23, p. 5588-5600, 2015.

VENTRELLA, M. C.; ALMEIDA, A. L.; NERY, L. A.; COELHO, V. P. M. **Métodos histoquímicos aplicados às sementes**. CEAD - Universidade federal de Viçosa, 2013.

WERNER, E. T.; MILANEZ, C. R. D.; MENGARDA, L. H. G.; VENDRAME, W. A.; CUZZUOL, G. R. F. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). **Acta Botânica Brasilica**, n. 24, p.1046-1051, 2010.

## ARTIGO 2 - OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS DOS GENÓTIPOS MODELOS DE JEQUITIBÁ-ROSA REMANESCENTE DO SUL DE MINAS GERAIS

### Resumo

O Jequitibá-rosa (*Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze), uma das espécies mais simbólicas da flora do Brasil, é uma espécie lenhosa com enormes proporções que podem atingir 30m a 50m de altura e 70 a 100cm de diâmetro. Atualmente possui exemplares distribuídos na Mata Atlântica, com agrupamentos inferiores a uma árvore por hectare nos fragmentos remanescentes. Esse fator aliado à baixa taxa de reprodução leva essa espécie ao estado de perigo de extinção, classificado na categoria vulnerável pela IUCN. O objetivo do trabalho é a obtenção de protoplastos com previsão de futuro melhoramento genético através da técnica de fusão protoplastos. Foram obtidos protoplastos através de calos induzidos de clones provenientes de espécimes de Paraguaçu, Machado e Divisa Nova. Os calos foram induzidos em meios de cultura WPM 3 mg/L<sup>-1</sup> BAP (6-benzilaminopurina) e 0,1 mg/L<sup>-1</sup> ANA (Ácido Naftaleno Acético). Para a degradação da parede celular, as células calosas foram submetidas a um tratamento com solução enzimática de celulase, pectinase em manitol junto com a solução W5. Foram realizados os testes de viabilidade celular por meio de contagem de células com azul de Evans 1%, com auxílio da câmara de Neubauer, e testada a influência da solução W5 na regeneração de protoplastos. Foi constatado que o uso da solução W5 não gerou diferença na obtenção de células. A partir desse processo é possível estabelecer um aperfeiçoamento para a obtenção de protoplastos dessa espécie.

**Palavras-chave:** Protoplastos. Jequitibá-rosa. Cultura de tecidos.

### Abstract

Jequitibá-rosa (*Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze), one of the most symbolic species of flora in Brazil, is a woody species with enormous proportions that can reach 30m to 50m in height and 70 to 100cm in diameter. Currently it has specimens distributed in the Atlantic Forest, with clusters smaller than one tree per hectare in the

remaining fragments. This factor, combined with the low reproduction rate, leads this species to the state of danger of extinction, classified in the vulnerable category by the IUCN. The objective of the work is to obtain protoplasts with a prediction of future genetic improvement through the protoplasty fusion technique. Protoplasts were obtained through calluses induced by clones from specimens from Paraguaçu, Machado and Divisa Nova. The calluses were induced in WPM 3 mg/L-1 BAP (6-benzylaminopurine) and 0.1 mg/L-1 ANA (Naphthalene Acetic Acid) culture media. For the degradation of the cell wall, the callous cells were submitted to a treatment with enzymatic solution of cellulase, pectinase in mannitol together with the W5 solution. Cell viability tests were carried out by counting cells with Evans blue 1%, with the aid of the Neubauer chamber, and the influence of the W5 solution on the regeneration of protoplasts was tested. It was found that the use of the W5 solution did not generate a difference in obtaining cells. From this process, it is possible to establish an improvement for obtaining protoplasts of this species.

**Keywords:** Protoplast. Jequitibá-rosa. Tissue Culture.

## 1 INTRODUÇÃO

A flora contida no território brasileiro é extensa, sendo que parte de suas espécies emblemáticas localizam-se na Mata Atlântica, da qual atualmente resta apenas 7% do seu território original (MMA, 2019). As florestas são fatores chaves para a manutenção de importantes serviços ecossistêmicos, assim como são imprescindível para a sobrevivência de espécies vegetais superiores. Entre os principais conflitos de ameaça à perda da floresta, destacam-se o avanço das fronteiras agrícolas e urbanas (LORENZI, 2016; PILATTI *et al.*, 2011).

A *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze, é uma espécie nativa e simbólica da Mata Atlântica, na qual se tem conhecimento de exemplares em: Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul (LORENZI, 2016; RODRIGUES, 2012). Embora sua ocorrência seja ampla entre os estados brasileiros, suas populações se encontram em baixa densidade (LEAL; SANTOS; GAIOTTO, 2014), de forma que a espécie atualmente se encontra classificada na categoria vulnerável pela IUCN (IUCN, 2020), em estado delicado de ameaça de extinção.

A reprodução do Jequitibá-rosa em seu ambiente natural encontra barreiras como o isolamento dos indivíduos, que com o passar do tempo vem produzindo poucas sementes. Além disso, indivíduos jovens começam a produção de sementes a partir dos 20 anos de idade, e a coleta destas em espécimes férteis se faz dificultosa devido a altura, sendo necessário o uso de técnicas de escalada.

Deste modo, diante da importância ecológica e comercial do Jequitibá-rosa, faz-se necessário o avanço e aprimoramento do cultivo *in vitro* da espécie, assim como seu melhoramento genético. Através da cultura de tecidos vegetais é possível selecionar plantas modelo para a multiplicação clonal, a qual permite acelerar a reprodução e ampliar a produtividade, podendo assim alavancar a conservação da espécie. A produção de protoplastos vegetais é uma alternativa que se destaca nesse campo, sendo uma unidade viva que corresponde a uma célula sem parede celular (PEREIRA; PUTZKE, 2010).

Os protoplastos vegetais fornecem um método experimental de célula única para estudos em vários campos importantes da biotecnologia vegetal, como a hibridização somática por fusão de protoplastos, variação somaclonal (protoclonal), manipulação genética, caracterização funcional de genes de plantas e edição de genoma (DAVEY *et al.*, 2005; GROSSER *et al.*, 2010). Eles podem ser isolados de diferentes tecidos, através da digestão enzimática da parede celular vegetal, o que auxilia a micropropagação *in vitro* de materiais que dependiam de tecidos específicos para o cultivo (DAVEY *et al.*, 2005). A regeneração através de protoplastos é um importante fator pois uma vez que os protoplastos podem ser isolados a partir de tecidos diversos, pode ser usado para avaliar a capacidade de regeneração de células diferenciadas e a base genética para a preservação de perda de capacidade de regeneração, no curso da diferenciação celular (VASIL, 2012).

O avanço no melhoramento genético de algumas plantas lenhosas comercialmente importantes foi alcançado com a exploração desses sistemas de regeneração de protoplasto (FU *et al.*; 2011; GROSSER; GMITTER 2011; SORIANO *et al.*, 2012; XIAO *et al.*, 2014). Protoplastos também foram utilizados com sucesso como um sistema de informação fisiológica em *Populus* (GUO *et al.*, 2012; TAN *et al.*, 2013) e algumas outras espécies de plantas, para estudar a expressão gênica transitória e determinar a localização de proteínas subcelulares,

bem como muitas outras caracterizações celulares, como interações proteína-proteína e proteína-DNA (YOO *et al.*, 2007; FARACO *et al.*, 2011).

Atualmente não existem estudos nessa natureza com a espécie *C. legalis*. Com isso, este trabalho possui o objetivo de obter protoplastos de Jequitibá-rosa através de calos oriundos de clones dos três maiores Jequitibás-rosa do Sul de Minas, visando futura preservação da espécie através de melhorias genéticas com os mesmos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Biotecnologia Ambiental e Genotoxicidade (BIOGEN), do Instituto de Ciências da Natureza, e no laboratório de Histologia do departamento de Ciências Biomédicas, ambos da UNIFAL-MG situados em Alfenas, no Sul do Estado de Minas Gerais.

### 2.1 MATERIAL VEGETAL E INDUÇÃO DE CALOS

Para a indução de calos foram utilizadas folhas de clones de Jequitibá-rosa localizados no Campus II – Santa Clara da UNIFAL-MG. A desinfestação das folhas foi feita em duas fases. A primeira foi realizada a lavagem das folhas com água corrente e esponja e depois as mesmas foram adicionadas em 1 litro de água com 2 gotas de Tween 20®, deixando em agitação magnética por aproximadamente 20 minutos. A segunda fase foi realizada inteiramente dentro da capela de fluxo laminar, na qual as folhas foram mergulhadas em etanol 70% por 2 minutos. Posteriormente as folhas cobertas com hipoclorito de sódio 2,5% + 2 gotas de Tween20®, deixando assim por 10 minutos. Após 10 minutos as folhas foram lavadas em água destilada.

Uma linhagem de calos foi estabelecida através de explantes foliares de Jequitibá-rosa. O meio de cultura de inoculação de folhas foi feito com WPM, com aditivo de 3 mg/L<sup>-1</sup> BAP (6-benzilaminopurina) e 0,1 mg/L<sup>-1</sup> ANA (Ácido Naftaleno Acético). Foram acrescidos Fungicida Sistêmico (Cercobin ®) e Polivinilpirrolidona (PVP), nas concentrações de 0,07g/L e 0,4g/L respectivamente. Como fonte de carbono foi utilizada 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,7 % de Ágar como agente de solidificação, o pH foi ajustado para 5,8. Após a inoculação dos segmentos foliares,

os mesmos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo 12/12, temperatura de  $25 \pm 1$  °C e intensidade de luz de  $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Todo o material de cultura foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a 121 ° C.

## 2.2 PREPARO DE SOLUÇÕES

Devido à inexistência de estudos sobre a obtenção de protoplastos com o Jequitibá-rosa, foi utilizado como base para execução os trabalhos de Carvalho & Sena 2007 e Park 2012.

Foram preparadas duas soluções para a obtenção de protoplastos, a solução enzimática e a solução W5. A Solução W5 tem a função de estabilizar a estrutura da célula, devido a inexistência de parede celular no protoplasto. Essa solução é constituída por de NaCl (Cloreto de Sódio),  $\text{CaCl}_2$  (Cloreto de Cálcio), KCl (Cloreto de Potássio), glicose e tampão Buffer de pH 5,6, com as concentrações apontadas na tabela 1. Após a mistura dos sais, a solução foi colocada no shaker em 40 rpm por 24 horas.

Tabela 1 - Concentrações dos sais utilizados para a produção da solução I - W5.

As concentrações dos reagentes foram todas em milimolar (mM).

<b>Reagentes</b>	<b>Concentrações (mM)</b>
NaCl	300
$\text{CaCl}_2$	250
KCl	10
Buffer pH 5,6	3
Glicose	10

Fonte: A Autora (2019)

A solução enzimática tem a função de degradar a parede celular. Trata-se de uma solução composta de uma mistura das enzimas 1% celulase e 0,7% pectinase dissolvidas em 0,7 M de manitol. As concentrações da solução enzimática são mostradas na tabela 2.

Tabela 2 - Concentrações dos reagentes utilizados na produção da solução II - enzimática

<b>Reagentes</b>	<b>Concentrações</b>
Celulase	1%
Pectinase	0,7%
Manitol	0,7 M

Fonte: Do Autor (2019)

### 2.3 ISOLAMENTO DE PROTOPLASTOS

Em câmara de fluxo laminar, uma média de 250mg de calos foram colocados em um placa de Petri na qual foi adicionado 15 ml de mistura da solução I e da solução II, ambas previamente filtradas em microfiltro (10 ml de solução enzimática e 5 ml de solução W5). A placa foi envolvida por papel alumínio e foi deixada de repouso por aproximadamente 24 horas.

Para uma segunda avaliação, 250mg de calos foram adicionados a 10 ml de solução enzimática previamente filtrada em microfiltro. As placas foram envolvidas em papel alumínio e deixadas de repouso por aproximadamente 24 horas.

Após 24 horas, os calos e as soluções foram filtrados em lã de vidro. O filtrado foi armazenado em tubos Falcom e submetido a uma série de centrifugações na centrífuga Eppendorf®. A primeira centrifugação foi a 4000 rpm com duração de 10 minutos. Após o tempo determinado, o sobrenadante foi descartado e suspenso com 2 ml de Manitol. A segunda centrifugação foi de 4000 rpm com duração de 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e suspenso em 2 ml de Manitol.

Do material obtido foram separados 200 µL de protoplastos de cada tratamento em eppendorf, com o intuito de realizar contagem de células viáveis. Outra porção de 1000 µL de cada tratamento foram suspenso em 60 ml de meio de cultura próprio para protoplastos. O meio de cultura para protoplastos foi composto por WPM meia força do tipo semissólido, no qual foi acrescido de ANA, BAP, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, KCl e glicose, nas concentrações indicadas na tabela 3.

Tabela 3 - Constituição e concentração dos reagentes utilizados na produção do meio de cultura ideal para cultivo de protoplastos.

<b>Reagentes</b>	<b>Concentrações</b>
Agar	2 g/L
ANA	0,1 mg/L
BAP	4 mg/L
NaCl	0,3 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,25 mM
KCl	0,01 mM
Glicose	0,01 mM

Fonte: Do Autor (2019)

## 2.4 ANÁLISE DE VIABILIDADE DE CÉLULAS SUSPENSAS

Para analisar a viabilidade das células formadas, foram colocados 200 µL de cada tratamento em eppendorf's, com 100 µL de azul de Evans 1% e 600 µL de água destilada. A mistura foi levemente agitada para homogeneizar e foi analisada em câmara de Neubauer no microscópio óptico. Para a contagem, o avaliador utilizou 20 µL da mistura com a diluição na proporção de 1:1. A câmara de Neubauer foi dividida em quatro quadrantes e as células foram contadas com auxílio do contador manual. Foram contadas as células em que não se observou coloração azul em seu interior.

Para analisar a regeneração diária das células, os tratamentos que foram inoculados em meio WPM foram analisados ao final de 15 dias. Essa análise foi realizada diariamente durante seis dias consecutivos. Para que se pudesse contar o número de células, foi retirado uma amostra de cada tratamento, feita uma diluição na ordem de 1:10, adicionado uma gota do corante Azul de Evans 1%, e posteriormente diluído novamente na ordem de 3:43 para uma melhor visualização. Para a contagem foi colocado 20 µL da amostra na câmara de Neubauer e analisado no microscópio óptico.

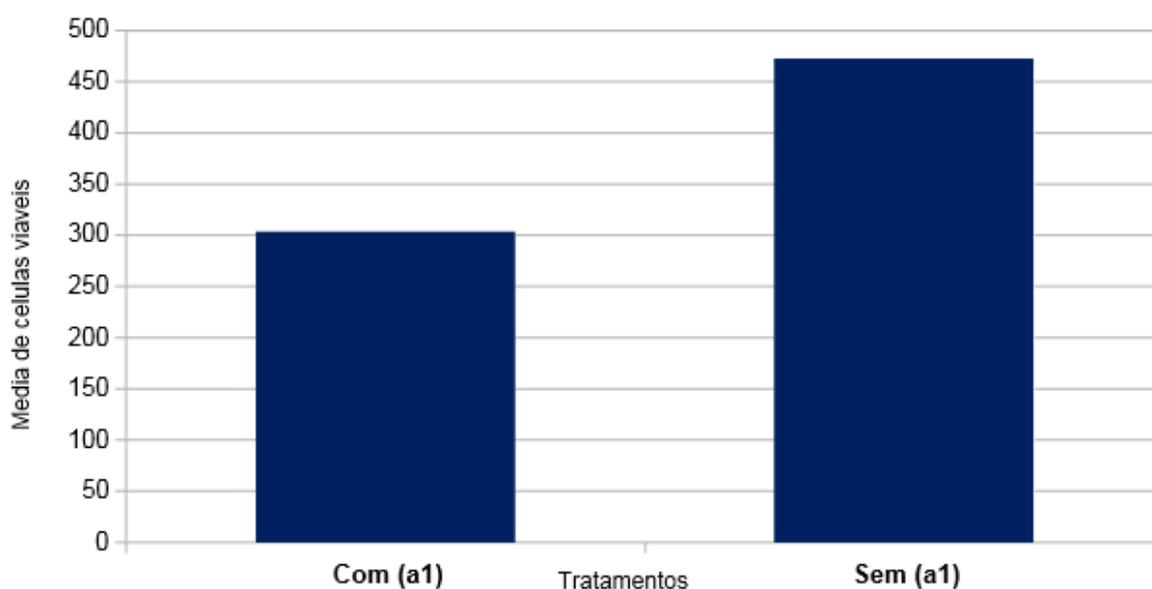
Os dados foram analisados pelo teste de médias (Tukey) no valor de 5% de significância pelo programa SisVar.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR

Em relação à viabilidade foi observado que não houve uma diferença significativa entre as células cultivadas com a solução W5 e as células cultivadas sem a solução W5. O gráfico 1 demonstra que ambos os tratamentos são estatisticamente iguais e que não diferiram entre si. A tabela 4 mostra a quantidade de células viáveis observadas por quadrante na presença de solução W5 e na ausência de W5.

Figura 1 – Gráfico representativo do Teste Tukey para viabilidade celular. A primeira barra é referente ao tratamento realizado na presença da solução W5 e a segunda barra é referente ao tratamento realizado na ausência de W5. (a1) em ambas as barras significa que os tratamentos não diferiram entre si.



Fonte: A autora (2019)

Tabela 4 - Número de células viáveis observadas em tratamentos sem a solução W5 e com a solução W5. Foram consideradas viáveis aquelas células que não tinham coloração azul em seu interior.

TRATAMENTO	QUADRANTE	CÉLULAS VIÁVEIS
Sem W5	1	445
Sem W5	2	383
Sem W5	3	581
Sem W5	4	475
Com W5	1	276
Com W5	2	347
Com W5	3	272
Com W5	4	315

Fonte: A autora (2019)

O estabilizador osmótico é um componente importante no processo de protoplastização, pois deve promover condições favoráveis para a atividade enzimática e, principalmente, após a remoção da parede celular, o soluto deve garantir a integridade da célula até a síntese da nova parede (MARCHI *et al.*, 2006). De acordo com os resultados pode-se inferir que a solução W5 não é um fator que afeta a viabilidade das células no processo e que também não interfere na morte celular.

Para que se possa melhorar o desempenho de estabilizante estrutural, pode ser necessário alterar as concentrações dos reagentes usados ou até mesmo a substituir algum dos reagentes.

### 3.2 ANÁLISE DE VIABILIDADE DE PROTOPLASTO

A contagem foi realizada de modo em que só foram considerados protoplastos os quais não estavam corados e indicando que esses mesmos estavam viáveis. A contagem foi realizada todos os dias durante 6 dias seguidos. Para se saber a quantidade de protoplastos presentes em cada ml de solução utilizou-se a fórmula a seguir para realizar os cálculos. Após a contagem e os cálculos feitos para saber a quantidade de células presentes em “ml” de solução chegou-se aos resultados que estão dispostos na tabela 5.

Figura 2 - Formula para calcular o nº de células por volume. FD = fator de diluição.

Nº de quadrantes = 16.

$$\frac{\text{nº total de células}}{\text{nº de quadrantes contados}} \times \text{FD} \times 1000 = \text{Nº de células/ml}$$

Fonte: A Autora (2019)

Tabela 5 - Análise de células regeneradas por dia e por tratamentos, no total foram 6 dias de avaliação.

<b>Dia</b>	<b>Com W5</b>	<b>Sem W5</b>
1	168437	215833
2	7969375	15022917
3	8287188	12428750
4	9928334	10908229
5	12713230	14100625
6	16238959	15018646

Fonte: Do Autor (2019)

É possível notar que o tratamento com a ausência de solução W5 apresentou um maior número de células regeneradas. Isso se dá devido à ineficiência da função da solução e também joga-se que a solução W5 tenha tido um efeito negativo na regeneração celular.

O teste de médias revelou que o número total de células regeneradas dos 2 tratamentos são estatisticamente diferentes, sendo que o tratamento que apresentou a maior média foi o tratamento realizado sem a solução W5 (Tabela 6). Deduz-se a partir de então que a solução W5 teve efeito negativo na regeneração celular.

Tabela 6 - Teste tukey pela média de protoplastos por tratamento

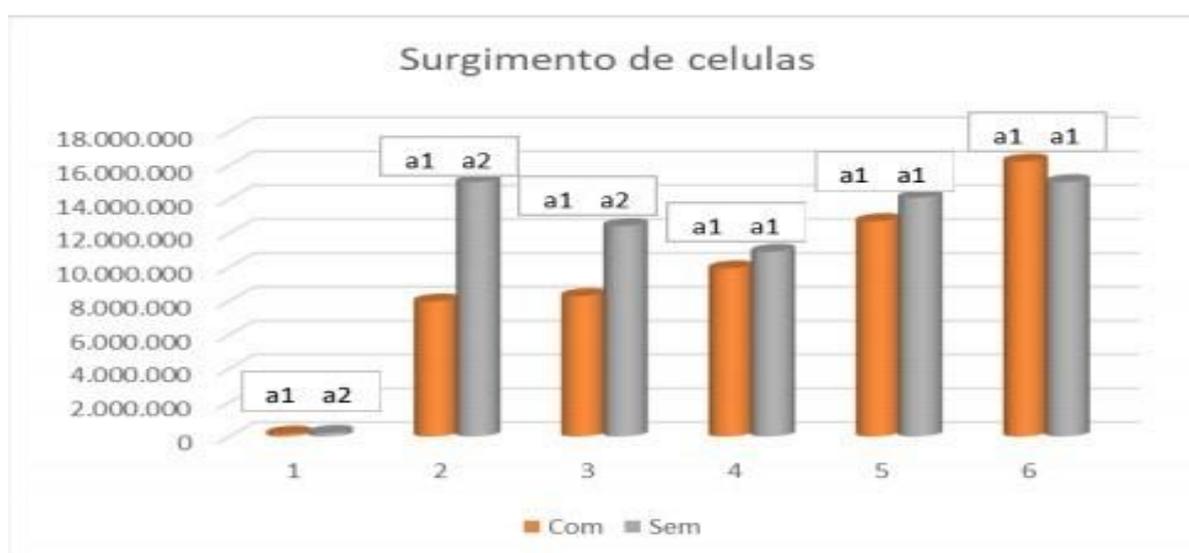
<b>Tratamento</b>	<b>Médias</b>	<b>Resultado Teste</b>
Com	168437	a1
Sem	16238959	a2

Fonte: A autora (2019)

### 3.3 TESTE DE FATORIAL DUPLO

A análise de fatorial duplo foi realizada para as variáveis de dias e tratamentos, feito pelo teste de Tukey, com significância de 5% ( $p > 0,05$ ). Os resultados mostraram que nos primeiros três dias de análise o número de células regeneradas foram estatisticamente diferentes, porém a partir do quarto dia o número de células regeneradas foram estatisticamente iguais (Gráfico 3). Não foi realizado nenhum teste para verificar a composição, função e estabilidade da parede celular após a regeneração celular.

Figura 3 - Resultado do teste de Fatorial duplo, analisando a interação da influência da solução W5 com o tempo de cultivo.



Fonte: Do Autor (2019)

Nesta análise de variância foi analisado se há diferença entre o desenvolvimento na regeneração de protoplastos com solução W5 e na ausência da solução, no qual se tem a função de osmoprotetor celular. Com o analisado pode-se pressupor que há diferença entre o crescimento dos tratamentos nos primeiros três dias, e que sem a solução W5 obteve-se um melhor número de células, após o terceiro dia em diante não houve diferença. Sabendo que a multiplicação celular começa posteriormente da regeneração da parede celular, ocorrendo depois de 24 horas após a inoculação (CARVALHO; SENA, 2007), se torna necessários mais testes com tempos superiores ao averiguado no presente estudo.

A partir das análises realizadas, conclui que as funções da solução W5 de proteger a célula de stress osmótico externo não está adequado, no qual poderá se adequar em futuros estudos.

### 3 CONCLUSÃO

É possível obter protoplastos através de calos de Jequitibá-rosa induzidos através de explantes foliares cultivados com 3 mg/L<sup>-1</sup> BAP (6-benzilaminopurina) e 0,1 mg/L<sup>-1</sup> ANA (Ácido Naftaleno Acético), utilizando solução enzimática composta por NaCl, CaCl<sub>2</sub>, KCl, glicose e tampão Buffer de pH 5,6. A solução W5 não desempenhou uma diferença significativa na obtenção de protoplastos de Jequitibá-rosa, sendo que sua função de osmoprotetor não foi estabelecida.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG), à CAPES, à FAPEMIG e Bercas OEA-GCUB.

### REFERÊNCIAS

CARVALHO, J. M. F. C.; SENA D. V. A. **Hibridação Somática**. Campina Grande: Embrapa, 2007.

DAVEY, M. R.; ANTHONY, P.; POWER, J. B.; LOWE, K. C. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. **Biotechnol Adv.**, n. 23, p.131-171, 2005.

DAVEY, M. R.; ANTHONY, P.; POWER, J. B.; LOWE, K. C. Plant protoplast technology: current status. **Acta Physiol Plant**, v. 27, p, 117-129, 2005.

FARACO, M.; Di SANSEBASTIANO, G. P.; SPELT, K.; KOES, R. E.; QUATTROCCHIO, F. M. One protoplast is not the other!. **Plant Physiol**, v.156, p. 474-478, 2011.

FU, J.; Peng, Z. J.; CAI, X. D.; GUO, W. W. Regeneration and molecular characterization of interspecific somatic hybrids between *Satsuma mandarin* and two

seedy sweet oranges for scion improvement. **Plant Breed**, n.130, p. 287-290, 2011.

GROSSER, J. W.; GMITTER, F. G. Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus. **Plant Cell Tiss Org Cult**. v. 104, p.345-357, 2011.

GROSSER, J. W.; ČALOVIĆ, M.; LOUZADA E. S. Protoplast fusion technology—somatic hybridization and cybridization. In: Davey MR, Anthony P (eds) **Plant cell culture: essential methods**. Wiley, NY. p. 175-198, 2010.

GUO, J.; MORRELL-FALVEY, J. L.; LABBÉ, J. L.; MUCHERO, W.; KALLURI, U. C.; TUSKAN, G. A.; CHEN, J. G. Highly efficient isolation of *Populus* mesophyll protoplasts and its application in transient expression assays. **PLoS One**, n. 44908, v. 7, 2012.

IUCN (2019). **Internacional Union for Conservacion of Nature Red List Threatened Species**. Version 2012. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 15 Jul. 2019.

LEAL, J. B.; SANTOS, R. P.; GAIOTTO, F. A. Effect of seletive logging on diversity and gene flow in *Cariniana legalis* sampled from a cacao agroforest system. **Genetics and Molecular Research**, n. 13, p. 626-635, 2014.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 7. ed. Nova Odessa: Plantarum, v. 1, 2016.

MARCHI, C. E.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; QUEIROZ, M. V. DE; MIZUBUTI, E. S. G. Obtenção e regeneração de protoplastos de *Magnaporthe grisea*. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 3, p. 232- 238, 2006.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Site oficial do Ministério do Meio Ambiente**. Disponível em: Acesso: Junho de 2019.

PARK, J. K. et al. **Protoplast Isolation and Fusion**. In: Plant Tissue Culture – cap. 13, 2012.

PEREIRA, A. B.; PUTZKE, J. **Dicionário brasileiro de botânica**. Ed. CRV, 2010.

PILATTI, F. K. et al. *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 47, p. 82 - 98, 2011.

RODRIGUES, B. P. et al. *Cariniana legalis* (Mart.) Kuntze (Lecythidaceae): Descrição dendrológica e anatômica. **Enciclopédia Biosfera**, n. 8, p. 419-427, 2012.

SORIANO, L.; FILHO, F. A. A. M.; CAMARGO, L. E. A.; CRISTOFANI-YALY, M.; LATADO, R. R.; PACHECO, C. A.; AZEVEDO, F. A.; MENDES, B. M. J. Regeneration and characterization of somatic hybrids combining sweet orange and mandarin/mandarin hybrid cultivars for citrus scion improvement. **Plant Cell Tissue Org Cult**, v. 111, p. 385–392, 2012.

TAN, B.; XU, M.; CHEN, Y.; HUANG, M. Transient expression for functional gene analysis using *Populus* protoplasts. **Plant. Cell. Tissue. Org. Cult.**, 114, p. 11-18, 2013.

VASIL, I. **Plant regeneration and genetic variability**. Elsevier, 2012.

XIAO, S. X.; BISWAS, M. K.; LI M, Y.; DENG, X. X. ; XU, Q.; GUO, W. W. Production and molecular characterization of diploid and tetraploid somatic cybrid plants between male sterile Satsuma mandarin and seedy sweet orange cultivars. **Plant Cell Tissue Org Cult**, v. 116, p. 81-88, 2014.

YOO, S. D.; CHO, Y. H.; SHEEN, J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. **Nat Protoc**, n. 2, p. 1565-1572, 2007.