



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS**  
**NATURAIS**

**Vanessa de Abreu Feitosa**

**APLICAÇÃO DA GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *Adenanthera***  
***pavonina* L. COMO SUBSTITUTA PARCIAL DO ÁGAR EM MEIOS PARA O**  
**CULTIVO *IN VITRO* DE TECIDOS E ÓRGÃOS VEGETAIS.**

Fortaleza-Ce

2016

**VANESSA DE ABREU FEITOSA**

**APLICAÇÃO DA GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *Adenantha*  
*pavonina* L. COMO SUBSTITUTA PARCIAL DO ÁGAR EM MEIOS PARA O  
CULTIVO *IN VITRO* DE TECIDOS E ÓRGÃOS VEGETAIS.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará – *Campus* do Pici, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva.

Fortaleza-Ce

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

F336a Feitosa, Vanessa de Abreu.

Aplicação da galactomanana de sementes de *Adenanthera pavonina* L. como substituta parcial do Ágar em meios para o cultivo in vitro de tecidos e órgãos vegetais / Vanessa de Abreu Feitosa. – 2016.

96 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2016.

Orientação: Prof. Dr. André Luís Coelho da Silva.

1. Galactomananas. 2. *Adenanthera pavonina*. 3. Agente gelificante. 4. Blenda. 5. Cultura de tecidos vegetais. I. Título.

CDD 660.6

---

**VANESSA DE ABREU FEITOSA**

**APLICAÇÃO DA GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *Adenantha  
pavonina* L. COMO SUBSTITUTA PARCIAL DO ÁGAR EM MEIOS PARA O  
CULTIVO *IN VITRO* DE TECIDOS E ÓRGÃOS VEGETAIS.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará – *Campus* do Pici, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dr. Luiz Ferreira Aguiar Ponte  
Universidade Estadual Vale do Acaraú - UEVA

---

Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza  
Universidade Federal do Ceará - UFC

**A Deus.**

**Aos meus pais e à minha família.**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Professor Dr. André Luis Coelho da Silva, pelos ensinamentos, paciência e disponibilidade durante a orientação. Por todo o incentivo e críticas construtivas, que levo como aprendizado para minha vida.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, que se empenharam para transmitir conhecimento a todos os alunos, sendo parte importante da nossa formação.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Luiz Ferreira Aguiar Ponte e Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza, por aceitarem contribuir com o aperfeiçoamento desse trabalho, dedicando seu tempo e conhecimento.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Molecular (LAbBMol) e LaBiC (Laboratório de Biocristalografia), Samara, Talita, Vinícius, Mário, Rejane, Tanimana, Ana Beatriz, Igor, Wallady, Danilo, Germana, Eldo e João Pedro, por toda a parceria, aprendizados, ensinamentos e demonstrações de ajuda durante as atividades de laboratório, bem como momentos de descontração.

A todos os meus amigos pessoais, Zayra, Pâmela, Samara, Livia, Jamylle, Yvila, Karine, Stéfanie, Mailsa, Eliêta, Patrícia, Marcos, Ingrid pelo companheirismo, carinho e torcida para que tudo desse certo.

Aos meus pais, Evandir e Reginaldo, que dedicaram todo seu tempo, amor, atenção e conselhos, me incentivando e me dando apoio sempre que precisei. Aos meus Irmãos, Alexia, Débora e Reginaldo, por todas as demonstrações de amor, parceria e por estar sempre ao meu lado. Aos demais membros da família, primos, tios e tias, avó, cunhado, cunhada, sogro e sogra por acreditarem no meu potencial.

Ao meu namorado, Valderi, por todo o amor, carinho e apoio que me dá e por torcer sempre para o meu melhor.

À Universidade Federal do Ceará, pela estrutura concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido.

A todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho, para meu aprendizado e para minha formação pessoal e profissional.

*“Lembre-se que as pessoas podem tirar  
tudo de você, menos o seu conhecimento”.*

*Albert Einstein.*

## RESUMO

A cultura de tecidos vegetais, a qual possui inúmeras aplicações comerciais, é o conjunto de metodologias que permitem o cultivo de células, tecidos, órgãos ou partes de órgãos vegetais (explante) sob um meio nutritivo. O meio de cultura semi-sólido, além de diversos nutrientes para a planta, precisa de um agente gelificante, sendo o ágar o mais utilizado, porém de alto custo. Sistemas formulados por misturas de polissacarídeos (blendas) podem originar geis de grande interesse. Neste trabalho, objetivou-se avaliar a viabilidade técnica e econômica do uso da galactomanana (Gm) de sementes de *Adenanthera pavonina* L. como substituinte parcial do ágar em meios de cultura *in vitro* de plantas, utilizando a soja-perene (*Glycine wightii*) como modelo. Os endospermas (goma bruta) foram isolados, liofilizados e triturados, para posterior extração das Gm's. Para avaliar o potencial gelificante das Gm's, diferentes tratamentos (T) utilizando blendas de Ágar + Gm foram testados (Controle: 1% + 0%; T1: 0% + 1%; T2: 0,9% + 0,1%, T3: 0,7% + 0,3%; T4: 0,5% + 0,5%; T5: 0,3% + 0,7%). As blendas foram analisadas segundo alguns parâmetro qualitativos, reológicos e de difusão. Foi avaliado o efeito das blendas no desenvolvimento dos calos oriundos da micropopagação de explantes de hipocótilo e cotilédone de *G. wightii* em meio MS, bem como na germinação *in vitro* e no desenvolvimento das plântulas desta espécie. O rendimento de goma bruta das sementes de *A. pavonina* foi de aproximadamente 87%, já o de Gm extraída da goma bruta foi de 92%. Na análise qualitativa das características dos meios, T2, T3 e T4 obtiveram os melhores resultados, apresentando uma boa solidificação, além de homogeneidade e transparência bem similares aos do Controle. O estudo dos parâmetros reológicos revelou que as melhores interações, em termos de resistência do gel, ocorreram nos meios T2, T3 e T4, que apresentaram-se semelhantes ao controle, evidenciando um efeito sinérgico devido à forte e eficiente interação entre o ágar e as Gm's. Os meios T3 e T4 utilizados no ensaio de difusão mostrou que T4 apresentou a maior difusão, comparado ao T3 e ao controle. Tanto os calos cotilédones quanto os de hipocótilos de *G. wightii* cultivados no meio T3 apresentaram um padrão de crescimento similar ao do Controle. Já o meio T4 mostrou-se superior a T3 e Controle, possivelmente



influenciado pela maior quantidade de Gm, que pode ter sido usada como fonte de carbono pela cultura. Os percentuais de germinação de sementes, a velocidade de crescimento e o tamanho das plântulas de *G. wightii* nos meios T3 e T4 foram significativamente superiores aos do controle, indicando que a presença de Gm's nos meios podem influenciar, de maneira positiva, o processo germinativo. Do ponto de vista econômico, por ser facilmente extraída de uma planta amplamente distribuída no país e por apresentar um excelente rendimento (~ 90 %), a Gm de sementes de *A. pavonina* pode ser um componente promissor na substituição parcial do ágar usado nos meios de cultura de tecidos, proporcionando uma economia de até 50% por quilo de ágar utilizado.

**Palavras-chave:** Galactomananas. *Adenantha pavonina*. Agente gelificante. Blenda. Cultura de tecidos vegetais.

## ABSTRACT

Plant tissue culture, which has several commercial applications, is the set of methodologies that permit the cultivation of cells, tissues, organs or parts of plant organs (explant) in a nutritious medium. The semi-solid culture medium, beyond various nutrients to the plant, needs a gelling agent, being agar the most used of them, however it's expensive. Systems formulated by mixtures of polysaccharides (blends) may result in gels of great interest. This study aimed to evaluate the technical and economic feasibility of the use of galactomannan (Gm) of *Adenanthera pavonina* L. seeds as agar partial substituent in *in vitro* culture media of plants, using soy-perennial (*Glycine wightii*) as model. The endosperm (crude gum) were isolated, freeze-dried and crushed for subsequent extraction of Gm's. To evaluate the gelling potential of Gm's, different treatments (T) using blends of Agar+Gm were tested (Control: 1% + 0%; T1: 0% + 1%, T2: 0.9% + 0.1% Q3: 0.7% + 0.3%; Q4: 0.5% + 0.5%; T5: 0.3% + 0.7%). The blends were analyzed according to some qualitative, rheological and diffusion parameter. The effect of the blends in the development of callus coming from micropopagation of hypocotyl and cotyledon explants of *G. wightii* on MS medium, as well as *in vitro* germination and seedling development of this species. The yield of crude gum from the seeds of *A. pavonina* was approximately 87%, and the yield of Gm extracted from the crude gum was 92%. In the qualitative analysis of the medium's characteristics, T2, T3 and T4 have the best results, with good solidification, and good homogeneity and transparency similar to the control. The study of rheological parameters revealed that the best interactions, in terms of gel strength, occurred in the means T2, T3 and T4, which were similar to the control, demonstrating a synergistic effect due to the strong and efficient interaction between the agar and GM's. T3 and T4 mediums used in the diffusion assay showed that T4 had the highest diffusion, compared to T3 and control. Both cotyledon and hypocotyl callus of *G. wightii* grown in the medium T3 showed a growth pattern similar to that of control. T4 medium was superior to T3 and Control, possibly influenced by the greater amount of Gm, which may have been used as a carbon source for the culture. The percentages of seed germination, growth rate and size of *G. wightii* seedlings in T3 and T4 media were significantly higher than control, indicating that

the presence of Gm's in media can influence positively the germination. From an economic point of view, to be easily extracted from a plant widely distributed in the country and provide an excellent yield (~ 90%), the Gm of *A. pavonina* seeds may be a promising component in the partial replacement of the agar used in the tissue culture mediums, providing a economy of 50% per kg of used agar.

Keywords: Galactomannans. *Adenanthera pavonina*. Gelling Agent. Blend. Plant Tissue Culture.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Gemas axilares oriundas de algodão <i>Gossypium hirsutum</i> cultivadas <i>in vitro</i> .....	25
Figura 2 - Organogênese direta a partir de fragmentos de folha de Violeta africana <i>Saintpaulia ionantha</i> .....	26
Figura 3 - Calo friável oriundo de hipocótilo de plântulas de algodão <i>Gossypium hirsutum in vitro</i> .....	26
Figura 4 - Embriões somáticos de algodão <i>Gossypium. hirsutum</i> , obtidos a partir de explante de hipocótilo.....	28
Figura 5 - Estádio de desenvolvimento de embrião somático.....	28
Figura 6 - Estrutura molecular das galactoamananas.....	42
Figura 7 - Carol ou olho-de-pombo ( <i>Adenantha pavonina</i> L.).....	47
Figura 8 - Soja-perene ( <i>Glycine wightii</i> ).....	49
Figura 9 - Extração e processamento da goma endospermica de <i>Adenantha pavonina</i> para obtenção de galactomanana.....	60
Figura 10 - Galactomanana processada de <i>Adenantha pavonina</i> .....	61
Figura 11 - Meios gelificados com ágar 1% e a blenda ágar 0,5% + galactomanana 0,5%.....	62
Figura 12 - Calos de cotilédones (A) e hipocótilos (B) de <i>G. wightii</i> cultivados em meios MS gelificados com as blendas dos tratamentos 3 (ágar 0,7% + galactomanana 0,3%) e 4 (ágar 0,5% + galactomanana 0,5%).....	68
Figura 13 - Plântulas de <i>G. wightii</i> crescidas <i>in vitro</i> por 12 dias.....	74

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Difusão do azul de metileno em meios gelificados com ágar (1%) e com as blendas dos tratamentos 3 e 4.....	65
Gráfico 2 -	Gráfico 2 – Efeito das blendas dos tratamentos 3 e 4 no desenvolvimento dos calos de cotilédones e hipocótilos de <i>G. wightii</i> em meio MS.....	67
Gráfico 3 -	Diagrama das fases de crescimento de uma cultura de células em calos ou em suspensão celular.....	70
Gráfico 4 -	Curvas de crescimento baseado nos valores de peso seco dos calos cotiledonares e de hipocótilos de <i>G. wightii</i> cultivados em meio MS gelificados com as blendas dos tratamentos 3 e 4.....	71
Gráfico 5 -	Germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>G. wightii</i> em meios gelificados com ágar 1% e com as blendas dos tratamentos 3 e 4.....	72
Gráfico 6 -	Avaliação do crescimento das plântulas de <i>G. wightii</i> em meios gelificados com ágar 1% e com as blendas dos tratamentos 3 e 4.....	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das soluções concentradas utilizadas para a preparação do meio de cultivo MS.....	32
Tabela 2 - Análise qualitativa das características dos meios gelificados com as blendas ágar/ galacotomanana de <i>A. pavonina</i> .....	62
Tabela 3 - Análise reológica dos meios de cultura gelificados somente com ágar e com as blendas de ágar/ galactomanana de sementes de <i>A. pavonina</i> .....	63
Tabela 4 - Comparação entre o custo dos diferentes agentes gelificantes utilizados nos meios de cultura de tecidos vegetais.....	75

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1</b>	<b>Considerações gerais sobre cultura de tecidos vegetais.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1.1</b>	<b>Conceitos.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Breve histórico.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1.3</b>	<b>Aplicações.....</b>	<b>22</b>
<b>1.2</b>	<b>Algumas técnicas em cultura de tecidos vegetais.....</b>	<b>24</b>
<b>1.2.1</b>	<b>Micropropagação.....</b>	<b>24</b>
1.2.1.1	<i>Proliferação de gemas axilares.....</i>	25
1.2.1.2	<i>Indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta.....</i>	25
1.2.2.3	<i>Embriogênese somática.....</i>	26
1.2.2.3.1	<i>Embriogênese direta.....</i>	27
1.2.2.3.2	<i>Embriogênese indireta.....</i>	27
<b>1.2.2</b>	<b>Calogênese.....</b>	<b>28</b>
<b>1.2.3</b>	<b>Germinação in vitro.....</b>	<b>29</b>
<b>1.3</b>	<b>Principais componentes dos meios de cultura para plantas.....</b>	<b>30</b>
<b>1.3.1</b>	<b>Componentes inorgânicos: Macro e Micronutrientes.....</b>	<b>30</b>
<b>1.3.2</b>	<b>Componentes orgânicos.....</b>	<b>31</b>
1.3.2.1	<i>Vitaminas.....</i>	31
1.3.2.2	<i>Suplementos indefinidos.....</i>	32
<b>1.3.3</b>	<b>Carboidratos.....</b>	<b>33</b>
<b>1.3.4</b>	<b>Hormônios, Substâncias de crescimento e Reguladores de crescimento.....</b>	<b>34</b>
1.3.4.1	<i>Auxinas.....</i>	35
1.3.4.2	<i>Citocininas.....</i>	35
1.3.4.3	<i>Giberelinas.....</i>	36
<b>1.3.5</b>	<b>Agentes gelificantes.....</b>	<b>36</b>
1.3.5.1	<i>Ágar.....</i>	36
1.3.5.1.1	<i>Agarose.....</i>	38
1.3.5.2	<i>Goma gelana.....</i>	38

1.3.5.3	<i>Alginatos</i> .....	39
1.3.5.4	<i>Amido</i> .....	40
1.3.5.5	<i>"Kappa" Carragenana</i> .....	40
1.3.5.6	<i>Pectina</i> .....	41
1.3.5.7	<i>Outros agentes gelificantes</i> .....	41
1.4	<b>Galactomananas</b> .....	41
1.4.1	<b>Blendas ágar/galactomananas para cultura de tecidos vegetais e Propriedades Reológicas</b> .....	44
1.5	<b>Características botânicas das espécies <i>Adenanthera pavonina</i> L. e <i>Glycine wightii</i></b> .....	46
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	50
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	50
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	50
3	<b>MATERIAIS</b> .....	51
3.1	<b>Vegetal</b> .....	51
3.2	<b>Meios de cultura</b> .....	51
3.3	<b>Reguladores de crescimento</b> .....	51
3.4	<b>Outros reagentes</b> .....	51
4	<b>MÉTODOS</b> .....	52
4.1	<b>Obtenção do endosperma bruto de sementes de <i>A. pavonina</i></b> .....	52
4.2	<b>Processamento da goma endospermica de <i>A. pavonina</i></b> .....	52
4.3	<b>Extração da galactomanana da goma endospermica processada</b> .....	52
4.4	<b>Ensaio para preparação das blendas ágar/galactomanana de <i>A. pavonina</i></b> .....	53
4.5	<b>Análise reológica das blendas ágar/galactomanana</b> .....	53
4.6	<b>Desinfestação de explantes de <i>G. wightii</i> visando o estabelecimento <i>in vitro</i> da calogênese</b> .....	54
4.7	<b>Ensaio de difusão nos meios geilificados com as blendas ágar/galactomanana</b> .....	54
4.8	<b>Desinfestação de explantes de <i>G. wightii</i> visando o estabelecimento <i>in vitro</i> da calogênese</b> .....	55



4.9	Indução de calos em explantes de <i>G. wightii</i> .....	55
4.10	Manutenção e estabilização da cultura de calos de <i>G. wightii</i> .....	56
4.11	Efeito das blendas no desenvolvimento dos calos de <i>G. wightii</i> cultivados em meio MS.....	56
4.12	Germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>G. wightii</i> em meios de cultura contendo as blendas ágar/galactomanana e avaliação das plântulas.....	57
4.13	Análises estatísticas.....	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	59
6	CONCLUSÕES.....	76
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Considerações Gerais sobre Cultura de Tecidos Vegetais**

#### **1.1.1 Conceitos**

Por cultura de tecidos vegetais, ao qual também se faz referência como cultivo *in vitro* de plantas, entende-se o conjunto de metodologias que permitem o cultivo de células, tecidos, órgãos ou partes de órgãos de uma planta (explante) sob um meio nutritivo e em condições assépticas. Utilizam-se recipientes semi-herméticos e o cultivo realiza-se sob condições ambientais controladas de nutrientes, pH, iluminação, temperatura, umidade e ambiente gasoso. As condições controladas fornecem um ambiente propício para o crescimento e multiplicação da cultura (HUSSAIN *et al.*, 2012; CARVALHO, VIDAL, 2003).

Os cultivos de tecidos vegetais podem ser iniciados com qualquer parte da planta: gemas, raízes, folhas, células isoladas, protoplastos (célula sem parede celular), semente, embriões zigóticos e antera, por exemplo. A escolha de um ou de outro explante dependerá dos objetivos desejados e da disponibilidade e capacidade de resposta do material vegetal (CARVALHO, VIDAL, 2003).

Qualquer técnica de cultivo *in vitro* tem, como fim primário, dirigir o crescimento e o desenvolvimento do explante manipulado em um meio de cultivo. Este controle é exercido, basicamente, pela adição de substâncias de diversas naturezas ao meio de cultivo. Dentre essas substâncias, encontram-se macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, outros componentes orgânicos, reguladores de crescimento das plantas, fonte de carbono, agentes de gelificação (em caso de meio sólido) e água. Para evitar a contaminação dos meios por impurezas minerais, todos os sais utilizados na sua preparação devem ser de qualidade analítica (P. A.). Outro ponto de controle leva em conta as condições físicas (iluminação, temperatura, umidade) e químicas (pH) (CARVALHO, VIDAL, 2003; MURASHIGE, SKOOG, 1962).

Uma planta cultivada *in vitro* tem seu metabolismo heterotrófico e é por isso que necessita de água, macro e micronutrientes e carboidrato, como fonte de carbono (PIERIK, 1988).

### **1.1.2 Breve Histórico**

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica relativamente recente visto que os primeiros passos foram dados no início do século XX e os maiores avanços foram notados a partir da segunda metade do século (CARVALHO, VIDAL, 2003).

As bases teóricas deram-se em 1838, quando Schleiden e Schwann levantaram a hipótese de que toda célula tinha capacidade de gerar um indivíduo (Teoria da Totipotência) (CARVALHO, VIDAL, 2003). Em 1892, Sachs definiu que as plantas sintetizam substâncias capazes de formar órgãos e que apresentam distribuição de forma polar (SACHS, 1892).

De acordo com Torres *et al.* (1998) e Bridgen (1994), os primeiros trabalhos com cultura de tecido vegetal datam do início do século passado, quando Haberlandt (1902) tentou o cultivo, sem êxito, de células de tecidos somáticos de várias espécies de plantas em solução nutritiva. O desconhecimento dos reguladores de crescimento contribuiu para a falta de resultados positivos. Ainda conforme aqueles autores, dois anos mais tarde, Hanning (1904) obteve plantas viáveis de embriões maduros de duas crucíferas, os quais foram isolados assepticamente e crescidos em um meio de sais minerais suplementado com açúcar, mostrando, desse modo, a importância da adição do açúcar em meios de cultura.

Em 1922, Robbins e Kotte mantiveram, com sucesso, raízes de gramíneas em meio de cultura (ROBBINS, 1922; KOTTE, 1922). Ainda na mesma década, o primeiro trabalho envolvendo a cultura de tecido vegetal com aplicação prática foi realizado por Laibach (1925), que recuperou plantas híbridas de cruzamentos incompatíveis em *Linum austriacum* vs *L.perenne*. Tal trabalho contribuiu muito para os avanços na área de melhoramento vegetal, pois mostrou a viabilidade de obter híbridos oriundos de cruzamentos incompatíveis (FIGUEIREDO, TAKITA, 2004).

Os progressos na cultura de tecidos só foram possíveis a partir da década de 30 (CARVALHO, VIDAL, 2003). Em 1934, White manteve o crescimento de ápices de raízes de tomate, em meio líquido, por um período ilimitado. Neste mesmo ano, Kogh *et al.* identificaram o primeiro fitohormônio, a auxina, Ácido Indolacético (AIA) (WHITE, 1934; KOGH, 1934). Em 1939, Gautheret e Nocourt estabeleceram um protocolo para a manutenção de cultura de calo (agregado indiferenciado de células) de cenoura (GAUTHERET, 1939; NOCOURT, 1939). Neste mesmo ano, WHITE conseguiu manter calo de fumo em meio contendo AIA (WHITE, 1939).

Outros méritos no avanço das técnicas de cultivo *in vitro* são devidos às observações de Van Overbeek *et al.* (1941), que promoveram a diferenciação e o crescimento de calo a partir de embriões de *Datura stramonium*, pela inclusão de leite de coco no meio de cultivo. Em 1946, Ball regenerou plantas de *Lupinus* e *Tropaelum*, a partir da cultura de ápices caulinares. Este foi o primeiro relato de regeneração de plantas inteiras a partir desta técnica (BALL, 1946).

Em 1948, Skoog e Tsui demonstraram a regulação química da formação da parte aérea e raiz, em calo de fumo. Dentre os resultados, observaram que a adição de auxina no meio de cultura promoveu a inibição de brotações (SKOOG, TSUI, 1948). Em 1952, a suplementação do meio de cultura com auxina e leite de coco permitiu que Steward *et al.* obtivessem formação de calo em diversas espécies de plantas (STEWART *et al.*, 1952). No mesmo ano, Morel e Martin recuperaram plantas de Dália livres de Vírus do Mosaico pela cultura de ápices caulinares (MOEL, MARTIN, 1952).

Em 1953, Sussex e Steve, trabalhando com primórdio foliar, observaram que este originava uma planta (SUSSEX, STEVE, 1953). No mesmo ano, Tulecke obteve calo haplóide a partir do cultivo de pólen de *Gingko biloba* (TULECKE, 1953). No período de 1953 a 1954, Muir observou que células colocadas em meio de cultura continuavam se multiplicando. Em 1954, Muir *et al.* obtiveram a primeira planta a partir de uma célula isolada (MUIR *et al.*, 1954).

Com a descoberta da Cinetina (primeira citocinina) por Miller *et al.* (1955), foi possível demonstrar-se que a diferenciação da parte aérea, raiz ou ambos, em calo de fumo, era regulada pelo balanço hormonal auxina/citocinina. A

partir desta descoberta houve grandes avanços no estudo da cultura de tecidos vegetais.

Em 1958, Wickson e Thimann observaram que quando se aplicava cinetina a uma gema terminal ou lateral dormente, esta saía da dormência (WICKSON, THIMANN, 1958). No mesmo ano, houve os primeiros relatos de embriogênese somática a partir de tecidos em cultura, quando Reinert e Steward *et al.* obtiveram formação de embriões somáticos a partir de calo de cenoura (REINERT, 1958; STEWARD *et al.*, 1958). Ainda em 1958, Maheswari e Rangaswamy foram os primeiros relatar a regeneração *in vitro* de embriões a partir da cultura do nucelo, usando *Citrus* e *Mangifera* como modelo (MAHESWARI, RANGASWAMY, 1958).

O primeiro trabalho sobre o uso de cultura de tecidos vegetais para isolamento de mutante remonta a 1959, quando Melchers e Bergmann descreveram a seleção para tolerância a temperaturas extremas em cultura em suspensão de *Antirrhinum* (MELCHERS, BERGMANN, 1959).

A aplicação prática dessas observações veio com o trabalho de Morel (1960), que propagou vegetativamente *in vitro* orquídeas livres de vírus através da cultura de ápices caulinares, acelerando a propagação dessas plantas (micropropagação), demonstrando a potencialidade das aplicações comerciais da micropropagação. Ainda em 1960, Cocking desenvolveu o isolamento enzimático (com enzimas de degradação da parede celular) e a cultura de protoplastos (COCKING, 1960).

Em 1962, Murashige e Skoog mostraram que a fração inorgânica do extrato de folhas de fumo aumentava o crescimento de calos, e esses resultados serviram de base para a formulação do meio MS utilizado hoje na maioria dos laboratórios de cultura vegetal (MURASHIGE, SKOOG, 1962). Também em 1962, Kanta *et al.* Obtiveram sucesso na polinização *in vitro* de *Papaver somniferum*. Óvulos isolados eram colocados em cultura e, em seguida, grãos de pólen eram depositados sobre os mesmos, ocorrendo o desenvolvimento do tubo polínico, a fecundação, a formação do embrião e, posteriormente, a obtenção de sementes (KANTA *et al.*, 1962). Já em 1965, Aghion-Prat induziu a floração *in vitro* em tecidos de fumo (AGHION-PRAT, 1965).

Em 1966, Guha e Maheswari foram os pioneiros na indução de androgênese *in vitro* em *Datura*, a partir de grãos de pólen, mediante cultura de anteras (GUHA, MAHESWARI, 1966). Em 1970, Smith e Murashige relataram a primeira verdadeira cultura de meristemas propriamente dita (porção distal ao mais novo primórdio foliar) (SMITH, MURASHIGE, 1970). Em 1972, Murashige *et al.* divulgaram um trabalho de grande importância em citros, mostrando que, através do uso da microenxertia, poder-se-ia obter plantas livres de vírus e viróides, técnica essa que vem sendo utilizada rotineiramente em diversas culturas (MURASHIGE *et al.*, 1972). Ainda neste mesmo ano, Carlson *et al.* (1972) comunicaram a primeira fusão de protoplastos, obtida em *Nicotiana*.

Em 1974, Zaenen *et al.* descobriram que o plasmídeo “Ti” é o princípio indutor de tumores de *Agrobacterium*, uma bactéria de grande importância na transformação genética de plantas (ZAENEN *et al.*, 1974). Já em 1978, Melchers *et al.* conseguiram híbridos somáticos entre batata e tomate (MELCHERS *et al.*, 1978).

Em 1982, Krens *et al.* alcançaram a incorporação de DNA isolado por protoplastos, tornando possível a transformação de células vegetais a partir de um DNA isolado (KRENS *et al.*, 1982). Neste mesmo ano, Zimmermann obteve a fusão de protoplastos através de estímulo elétrico (ZIMMERMANN, 1982).

Em 1985, Horsch *et al.* obtiveram a infecção e a transformação genética de disco foliares de tabaco com *Agrobacterium*, bem como a regeneração das plantas transformadas *in vitro* (HORSCH *et al.*, 1985).

### **1.1.3 Aplicações**

A cultura de tecidos vegetais é uma importante ferramenta tanto em estudos básicos como aplicados comercialmente (THORPE, 1990). Uma das principais aplicações práticas da cultura de tecidos é a propagação vegetativa *in vitro* ou micropropagação, cujas principais vantagens são (FIGUEIREDO, TAKITA, 2004):

- a) Propagar material livre de doenças;
- b) Acelerar os métodos convencionais de propagação vegetativa;
- c) Produzir material vegetal em espaço reduzido e em grande escala

Como aplicação para limpeza clonal, pode-se usar uma variação da técnica de cultura de ápice caulinar, a microenxertia: esta é particularmente adequada para limpeza clonal de espécies lenhosas, quando houver exigência da manutenção de características adultas (como o florescimento), quando houver problemas de regeneração a partir de explante de meristema ou quando a parte aérea apresentar problemas de enraizamento no meio de cultura. A técnica consiste na enxertia, *in vitro*, do ápice caulinar de uma planta adulta selecionada, sobre um porta-enxerto cultivado *in vitro*, possibilitando a recuperação de plantas livres de vírus (FIGUEIREDO, TAKITA, 2004).

Outra importante aplicação da técnica de cultura de tecido vegetal é a manutenção do banco de germoplasma. A maioria dos bancos de germoplasma é de sementes; entretanto, a conservação *in vitro* tem-se mostrado eficiente alternativa às dificuldades apresentadas pela conservação em sementes (FIGUEIREDO, TAKITA, 2004).

A cultura *in vitro* pode gerar variações somaclonais (variações genotípicas e/ou fenotípicas ocorridas em plantas regeneradas) indesejáveis, em virtude da pressão de seleção do meio de cultura (SKIRVIN *et al.*, 1994), mas tais variações podem vir a ser de interesse agrônomo, como foi o caso do pimentão ‘Beu-sweet’, que apresentou reduzido número de sementes por fruto (TORRES *et al.*, 1998).

A cultura *in vitro* tem-se mostrado uma ferramenta indispensável tanto na incompatibilidade pré-zigótica quanto na pós-zigótica e, a partir dessa tecnologia, híbridos de espécies distantes vêm sendo produzidos em escala crescente. Um exemplo é a técnica de cultura de anteras, que permite obter híbridos oriundos de cruzamentos entre indivíduos com nível de ploidia diferente (FIGUEIREDO, TAKITA, 2004). Outra aplicação seria na Transformação Genética de Plantas. A engenharia genética permite que seja realizada a introgressão de qualquer gene caracterizado, alterando importantes rotas metabólicas promovendo, com isso, a alteração no tipo e na composição de amido, óleos, proteínas, vitaminas, etc., sem levar em consideração as usuais barreiras biológicas (BINSFELD, 2000). Com essas modificações objetiva-se (MONTEIRO, 2000):

- a) Elevar o valor nutricional dos alimentos;

- b) Melhorar o processamento industrial e a comercialização dos produtos;
- c) Desenvolver plantas transgênicas que funcionem como biorreatores, onde seja possível produzir polipeptídios de valor farmacêutico como, por exemplo, vacinas na forma de antígenos de vírus ou anticorpos;
- d) Produzir inúmeras enzimas (proteínas) para fins industriais, além dos benefícios ambientais que a engenharia genética pode trazer, pois a ideia dos produtos transgênicos é, em última análise, tornar a agricultura menos dependente de agrotóxicos e inseticidas

As técnicas da engenharia genética estão amplamente baseadas na cultura de tecidos, pois a transformação genética requer o cultivo, *in vitro*, de protoplastos, células e tecidos da planta que se deseja transformar como também das células e tecidos transformados para obter plantas transgênicas regeneradas (GYVES, 1994).

## **1.2 Algumas Técnicas em Cultura de tecidos vegetais**

### **1.2.1 Micropropagação**

A micropropagação ou clonagem é a propagação vegetativa *in vitro*, utilizada principalmente naquelas plantas de difícil multiplicação pelos métodos convencionais, permitindo a obtenção de grande número de plantas saudáveis e geneticamente uniformes em curto período de tempo. A maior concentração da atividade de micropropagação reside na limpeza clonal e na produção de mudas de espécies ornamentais herbáceas e arbustivas (BAJAJ, 1993).

Murashige (1974) apresentou o seguinte esquema padrão para sistemas de micropropagação:

- a) Estádio I - seleção de explantes, desinfestação e cultivo em meio nutritivo, sob condições assépticas;
- b) Estádio II - multiplicação dos propágulos através de sucessivas subculturas, em meio próprio para multiplicação;
- c) Estádio III - transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplante das plantas, obtidas para substrato do solo.



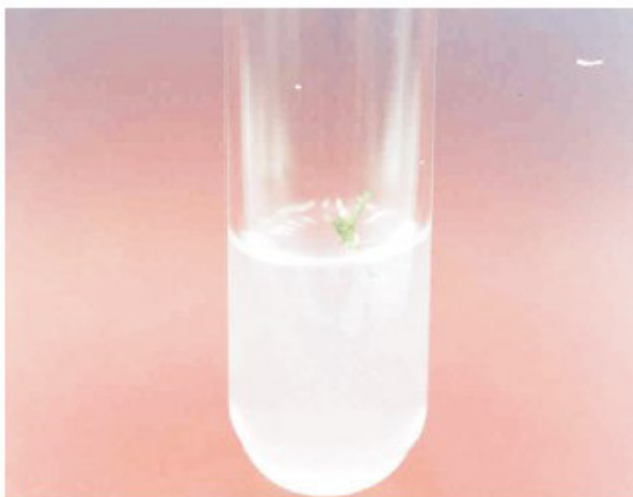
Este esquema pode variar conforme as peculiaridades de cada espécie, podendo ser necessária uma fase adicional de alongamento das partes aéreas antes do enraizamento, ou o esquema pode ser simplificado, eliminando-se a etapa de enraizamento *in vitro*, manipulando-se as partes aéreas como microestacas, as quais enraizam diretamente no substrato de transplante. Um estágio zero é, às vezes, citado, o qual corresponde ao tratamento dado à planta-matriz de onde são retirados os explantes (GRATTAPAGLIA, MACHADO, 1990).

Para se fazer a micropropagação, utilizam-se os métodos que se seguem.

#### 1.2.1.1 Proliferação de Gemas Axilares

Gemas axilares são estimuladas a crescer (Figura 1) formando brotos simples ou tufo de brotos que são divididos, dando origem a novos explantes. Segmentos apicais ou nodais são adequados como fonte de explantes para o processo de preservação de germoplasma *in vitro*. Tal material apresenta as seguintes vantagens: adaptação às condições *in vitro*; alto grau de valor genético da planta matriz; maior garantia de regeneração que meristemas ou calos, e economia de espaço para armazenamento.

Figura 1 - Gemas axilares oriundas de algodão *Gossypium hirsutum* cultivadas *in vitro*.



Fonte: Carvalho, Vidal, 2003

#### 1.2.1.2 Indução de Gemas Adventícias Por Organogênese Direta ou Indireta

Formação de gemas em locais não convencionais (Figura 2) tanto diretamente de tecidos com potencial morfogênético quanto indiretamente, através da formação de calos. Entende-se por calo (Figura 3) um aglomerado de células desorganizadas, formadas por células diferenciadas e não diferenciadas, que se dividem ativamente e que, em geral, se originam em zonas com injúrias químicas ou físicas (BAJAJ, 1989).

Figura 2 - Organogênese direta a partir de fragmentos de folha de *Violeta africana* *Saintpaulia ionantha*.



Fonte: Carvalho, Vidal, 2003

Figura 3 - Calo friável oriundo de hipocótilo de plântulas de algodão *Gossypium hirsutum* in vitro.



Fonte: Carvalho, Vidal, 2003

#### 1.2.1.3 Embriogênese Somática

Consiste na formação de embriões somáticos (embrióides) a partir de tecidos somáticos, com constituição idêntica à da planta-mãe, a não ser nos casos em que ocorre a embriogênese por via indireta, passando pela formação de calos, quando poderá ocorrer variabilidade genética. Para que ocorra embriogênese somática, as células diferenciadas devem ser primeiro desdiferenciadas (desprogramação gênica) para serem consideradas como células embriogênicas após a divisão celular (PASQUAL et al., 1997).

A indução de embriogênese não é muito fácil, senão impossível, no caso de muitas espécies vegetais. Entretanto, quando possível, apresenta várias vantagens sobre as técnicas de micropropagação, dentre elas se destacam (CARVALHO, VIDAL, 2003):

- a) a capacidade de produzir grande número de embriões num espaço limitado;
- b) os embriões são individualizados e se desenvolvem diretamente em plantas;
- c) os embrióides podem ser utilizados tanto na continuação da propagação *in vitro* quanto na produção de sementes sintéticas.

##### 1.2.1.3.1 Embriogênese Direta

Os embriões somáticos são originados diretamente do explante. A ocorrência de embriogênese direta tem sido registrada em tecidos gametofíticos, esporofíticos e em tecidos que se originaram em função da fertilização dos gametas. Este fenômeno ocorre com maior probabilidade em micrósporos dentro da antera e tecidos de partes do ovário, incluindo as paredes do ovário ou carpelos, óvulo, embrião zigótico ou plântulas jovens (BAJAJ, 1992a).

##### 1.2.1.3.2 Embriogênese Indireta

Os embriões somáticos são produzidos a partir de calo. A verdadeira embriogênese indireta (Figura 4) requer que as células diferenciadas de um

explante sejam induzidas a formar calos não-diferenciados e, então, algumas células se tornam comprometidas ou predeterminadas em uma rota embriogênica (BAJAJ, 1992b).

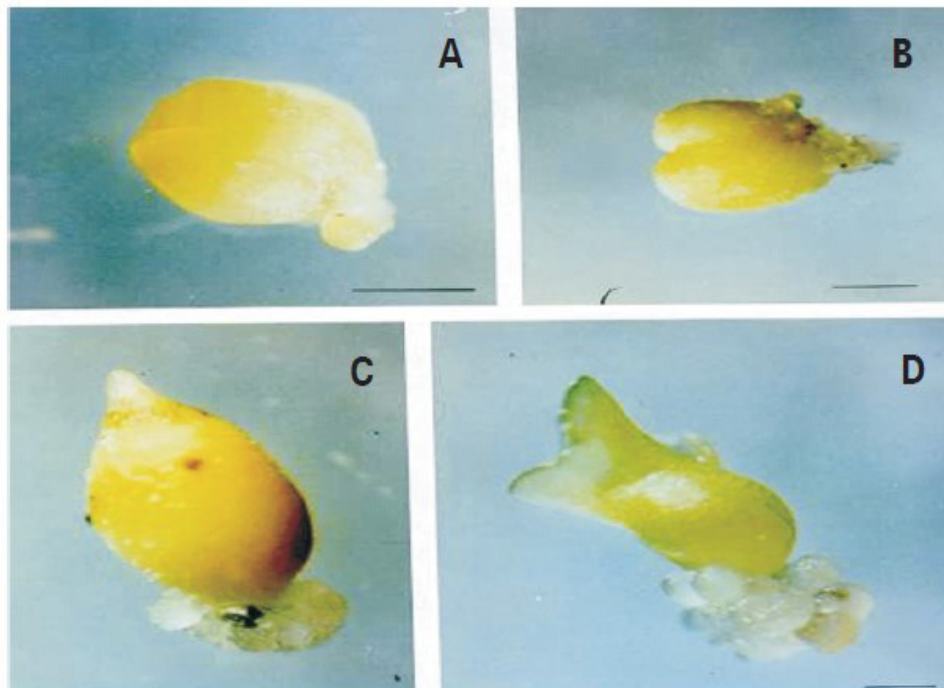
Figura 4 - Embriões somáticos de algodão *Gossypium. hirsutum*, obtidos a partir de explante de hipocótilo.



Fonte: Carvalho, Vidal, 2003

As formas dos embriões somáticos correspondentes às distintas fases de desenvolvimento, são: pró-embrióide, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Figura 5).

Figura 5 - Estádio de desenvolvimento de embrião somático: A) pró-embrióide; B) coração; C) torpedo e D) cotiledonar.



Fonte: Carvalho, Vidal, 2003

### **1.2.2 Calogênese**

Entende-se por Calogênese a indução e o desenvolvimento *in vitro* de calos. Calo é um aglomerado de células desorganizadas, formadas por células diferenciadas e não diferenciadas, que se dividem ativamente e que, em geral, originam-se em zonas com injúrias químicas ou físicas (BAJAJ, 1989).

A indução de calos em diferentes tecidos vegetais pode ocorrer inoculando-se explantes de qualquer parte da planta em meio de cultura com o estímulo de reguladores de crescimento ocorre a indução de crescimento, modificando o metabolismo celular. Nesse processo, a diferenciação e a especialização celular são revertidas e o explante dá início a um novo tecido composto por células meristemáticas não especializadas. Embora o calo continue desorganizado durante a multiplicação celular, alguns tipos de células especializadas podem ser formados ao acaso por meio de centros de morfogênese.

Essas células especializadas são capazes de iniciar a formação de órgãos como raízes, brotos e embriões somáticos (GEORGE *et al.*, 2008). Tecidos jovens meristemáticos são os mais indicados, mas é possível obter calogênese a partir de fragmentos já diferenciados (LOYOLA-VARGAS; VAZQUEZ-FLOTA, 2006; GEORGE *et al.*, 2008).

De acordo com Vietez & San-José (1996), muitas vezes é necessário o suprimento exógeno de reguladores de crescimento para a indução de calo. O balanço hormonal obtido entre os níveis de citocininas e auxinas, exógenas e endógenas à planta, pode estimular a proliferação celular. Em meios de cultura com razões intermediárias de auxina/citocinina ocorre proliferação celular desorganizada, como é o caso dos calos (TAKAHASHI, 2002).

### **1.2.3 Germinação *in vitro***

A germinação é um fenômeno caracterizado pela retomada do crescimento do embrião, com o subsequente rompimento do tegumento pela radícula, manifestando a capacidade para dar origem a uma plântula normal, sob condições ambientais favoráveis (NEVES *et al.*, 2009). Na tentativa de produzir

plantas mais saudáveis e livres de patógenos, a propagação *in vitro*, a partir de sementes (Germinação *in vitro*), apresenta-se como forma viável de produção, no entanto, diversos fatores podem afetar o potencial germinativo das sementes promovendo a formação de plântulas anormais, dentre eles, a presença de microrganismos, como fungos. Sendo assim, para que a propagação *in vitro* torne-se fonte confiável de material asséptico, os métodos de desinfestação devem ser eficazes, proporcionando a ausência de agentes patológicos.

O etanol e os compostos à base de cloro são as substâncias com ação germicida mais utilizadas neste processo (COUTO *et al.*, 2004; SOUSA *et al.*, 1999). O hipoclorito de sódio ou de cálcio vem mostrando grande eficiência na desinfestação de sementes, eliminando fungos e bactérias, assim como a utilização de fungicidas e bactericidas, promovendo aumento no total de plântulas germinadas a partir de sementes tratadas.

Em relação à regulação da germinação *in vitro*, o uso de reguladores de crescimento no meio de cultura é um ponto muito importante e crucial. Sabe-se, hoje, que as giberelinas têm um papel-chave nesse processo, estando envolvidas tanto na quebra da dormência como no controle da hidrólise de reservas, da qual depende o embrião em crescimento. Para diversas espécies, as giberelinas aceleram a germinação e a emergência (SOARES *et al.*, 2009).

### **1.3 Principais componentes dos Meios de Cultura para Plantas**

Órgãos e tecidos vegetais são cultivados *in vitro* em meios artificiais, que fornecem os nutrientes necessários para o crescimento. O sucesso da cultura de tecidos vegetais como um meio de propagação de plantas é muito influenciado pela composição do meio de cultura utilizado.

#### **1.3.1 Componentes Inorgânicos: Macro e Micronutrientes**

De acordo com Epstein (1971), um elemento químico pode ser considerado como essencial para o crescimento das plantas se:

- a) a planta não consegue completar seu ciclo de vida sem ele;
- b) a sua ação é específica e não pode ser substituído completamente por qualquer outro elemento;
- c) seu efeito sobre o organismo é direta, não indireta sobre o ambiente;

d) é um constituinte de uma molécula que é conhecida por ser essencial.

Para crescimento saudável e vigoroso, plantas intactas precisam captar:

a) Macronutrientes: Elementos inorgânicos requeridos em relativamente grandes quantidades: íons de Nitrogênio (N), potássio (K), cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg), e enxofre (S);

b) Micronutrientes: Elementos inorgânicos requeridos em pequenas quantidades: ferro (Fe), níquel (Ni), cloro (Cl), manganês (Mn), zinco (Zn), boro (B), cobre (Cu), e molibdênio (Mo).

As plantas absorvem os nutrientes inorgânicos que necessitam quase inteiramente como íons. Um íon é um átomo, ou um grupo de átomos, que ganhou uma carga positiva (um cátion) ou uma carga negativa (uma ânion). Nutrientes inorgânicos são adicionados ao meio de cultura de plantas na forma de sais. Em soluções aquosas, tais como os meios de cultura, esses sais dissociam-se em cátions e ânions, permitindo a captação.

### **1.3.2 Componentes Orgânicos**

O crescimento e a morfogênese de cultura de tecido de plantas podem ser melhorados através de pequenas quantidades de alguns nutrientes orgânicos. Estes são principalmente vitaminas (incluindo algumas substâncias que não são estritamente vitaminas animais), aminoácidos e certos suplementos indefinidos. A quantidade destas substâncias necessária para a cultura bem sucedida varia com a espécie e o genótipo, e é provavelmente um reflexo da capacidade de síntese do explante.

#### **1.3.2.1 Vitaminas**

As vitaminas são compostos que os animais necessitam quantidades muito pequenas, como fatores alimentares acessórios necessários. A ausência delas na dieta leva a crescimento e desenvolvimento anormais e uma condição não saudável. Muitas das mesmas substâncias também são necessárias por células de plantas, como intermediários essenciais ou catalisadores metabólicos, mas plantas intactas, ao contrário dos animais, são capazes de produzir as suas próprias necessidades. Porém, células e tecidos de plantas cultivadas *in vitro*

podem, contudo, tornar-se deficiente em alguns desses fatores, e então o crescimento e a sobrevivência podem ser melhorados pela adição das vitaminas ao meio de cultura.

As vitaminas mais freqüentemente usadas em meios de cultura tecidos de plantas são de tiamina (ou vitamina B1), ácido nicotínico (niacina) e piridoxina (ou vitamina B6) e mio-inositol. Estas são as vitaminas componentes no meio de cultura mais comum para plantas, o MS, elaborado por Murashige e Skoog (1962) (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição das soluções concentradas utilizadas para a preparação do meio de cultivo MS.

Solução A (Macronutrientes)	mg/mL
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16.500
KNO <sub>3</sub>	19.000
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	4.400
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	3.700
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.700
Solução B (Micronutrientes)	mg/mL
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.200
MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O	16.900
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	8.600
KI	830
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	250
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	25
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	25
Solução C (Fonte de Ferro)	mg/mL
Na <sub>2</sub> EDTA*2H <sub>2</sub> O	3.725
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	2.785
Solução D (Vitaminas e outros suplementos orgânicos)	mg/mL
Mio-inositol	10.000
Tiamina-HCl	10
Piridoxina-HCl	50
Ác. Nicotínico	50
Glicina	200

Fonte: Murashige e Skoog, 1962.



#### 1.3.2.2 Suplementos Indefinidos

Muitos suplementos indefinidos foram empregados nos primeiros meios de cultura de tecido estudados. Seu uso tem diminuído lentamente, a partir do momento em que o equilíbrio entre sais inorgânicos foi melhorado, e que o efeito de aminoácidos e substâncias de crescimento tornou-se melhor compreendido. Apesar disso, inúmeros suplementos de composição incerta e variável ainda estão em uso comum.

As primeiras culturas bem sucedidas de tecido vegetal envolveram a utilização de Extrato de levedura (ROBBINS, 1922). Outras adições feitas aos meios de cultura indefinidos para plantas são extrato de batata, Extrato de malte, homogenato de banana e Água de coco.

Muitos desses suplementos podem ser uma fonte de aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos, carboidratos, vitaminas e substâncias de crescimento para plantas em diferentes concentrações.

#### 1.3.3 Carboidratos

Os carboidratos desempenham um papel importante em culturas *in vitro* como uma fonte de carbono e energia, bem como um agente osmótico. Apenas um número limitado de linhagens de células de plantas tem sido isolado com comportamento autotrófico quando cultivadas *in vitro*. Células autotróficas são capazes de abastecer totalmente suas próprias necessidades de carboidratos por assimilação de dióxido de carbono durante a fotossíntese (BERGMANN, 1967; TANDEAU DE MARSAC; PEAUD-LENOEL, 1972; CHANDLER *et al.*, 1972; LAROSA *et al.*, 1981).

Muitas culturas autotróficas foram apenas capazes de um crescimento relativamente lento (FUKAMI; HILDEBRANDT, 1967), especialmente na atmosfera ambiente em que a concentração de dióxido de carbono é baixa. Então, para a cultura normal de qualquer célula, tecidos ou órgão vegetal, é necessário incorporar uma fonte de carbono ao meio, como uma fonte enérgica. A sacarose é quase universalmente utilizada para fins de micropropagação, uma vez que é geralmente utilizável por culturas de tecidos.

A presença de sacarose em meios de cultura inibe especificamente a formação da clorofila e a fotossíntese, fazendo o crescimento autotrófico menos viável.

#### **1.3.4 Hormônios, Substâncias de Crescimento e Reguladores de Crescimento**

Raven *et al.* (1978), define os hormônios vegetais como substâncias orgânicas, ativas em pequenas quantidades, produzidas em um tecido e transportadas para outro, onde provocam respostas fisiológicas. Refere que o termo hormônio vem do grego e significa “excitar”. Chama a atenção para o fato de que muitos hormônios possuem influências inibidoras, sendo, portanto, mais apropriado considerá-los como mensageiros químicos do que como estimuladores.

Ferri (1986) define os hormônios ou substâncias de crescimento como substâncias produzidas pela própria planta que, em concentrações baixas, promovem, inibem ou modificam qualitativamente o crescimento, geralmente em um local diferente daquele onde foi produzido. Diz que os hormônios ou substâncias de crescimento são, portanto, obrigatoriamente produzidos por plantas e delas podem ser extraídos, já as substâncias reguladoras de crescimento, ou reguladores de crescimento, são substâncias sintéticas (sempre podem ser sintetizadas em laboratório) não produzidas por plantas, mas que produzem efeitos semelhantes aos produzidos pelos hormônios. Refere que muitas das substâncias reguladoras de crescimento são análogos químicos de alguns hormônios, outras não.

Ferri (1986) refere ainda os cinco principais grupos de substâncias que são consideradas como hormônios vegetais:

- a) auxinas;
- b) citocininas;
- c) giberelinas;
- d) etileno;
- e) ácido abscísico.

Os três primeiros são os principais para Cultura de Tecidos Vegetais e serão abordados a seguir.

#### 1.3.4.1 Auxinas

Auxinas são amplamente utilizados em cultura de tecidos de plantas e geralmente formam uma parte integrante do meio nutriente. Elas promovem, principalmente em combinação com citocininas, o crescimento dos calos, órgãos e suspensões de células, e também regulam a direção da morfogênese (alta relação Auxina/Citocinina induz formação de raízes).

A palavra auxina tem uma origem grega: Auxein significa ampliar ou crescer. Ao nível celular, auxinas controlam processos básicos, tais como a divisão e o alongamento celulares. Uma vez que elas são capazes de iniciar divisão celular, elas estão envolvidas na formação de meristemas que dão origem a qualquer tecido desorganizado, ou órgãos definidos. Em tecidos organizados, as auxinas estão envolvidas na criação e manutenção de polaridade; e em plantas inteiras seus efeitos mais marcantes são a manutenção da dominância apical e a mediação de tropismos (FRIML, 2003).

As auxinas utilizadas com maior frequência em cultivo *in vitro*, são: ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-3-butírico (AIB), ácido  $\mu$ -naftalenoacético (ANA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). O AIA é uma auxina que, comumente, é adicionada a concentrações relativamente elevadas (1-30 mg/L) devido ao fato de se decompor na presença de luz, mediante oxidação enzimática. As outras auxinas mencionadas são sintéticas e mais ativas utilizando-se, portanto, em concentrações inferiores (CARVALHO, VIDAL, 2003).

#### 1.3.4.2 Citocininas

Trata-se de um grupo de reguladores de crescimento que estimula a divisão celular, sobretudo junto de uma auxina. As citocininas mais utilizadas em cultivo *in vitro*, são: kinetina (KIN), zeatina (citocinina natural), 6-benzilaminopurina (BAP ou BA) e 6-(g,g-dimetilalimino) purina (2iP).

Em concentrações elevadas induzem à formação de brotos adventícios e inibem a formação de raízes; são, assim, responsáveis pela eliminação da dormência apical, promovendo o desenvolvimento das gemas axilares (CARVALHO, VIDAL, 2003).

#### **1.3.4.3 Giberelinas**

São reguladores de crescimento que induzem o desenvolvimento dos nós e o crescimento dos meristemas, ou gemas *in vitro*; podem, também, romper a dormência de embriões isolados ou gemas e inibir a formação de raízes e brotos adventícios, e são utilizados com menor frequência que as auxinas e as citocininas.

Dentro das giberelinas, o ácido giberélico (GA3) é o mais empregado. Deve-se ter em conta que o GA3 perde 90% de sua atividade ao se esterilizar junto ao meio na autoclave (PIERIK, 1988).

#### **1.3.5 Agentes Gelificantes**

Meios gelificados fornecem suporte por meio de matrizes semi-sólidas que são amplamente utilizados para cultura de protoplastos, células, tecidos e órgãos. A vantagem de suportes, ao contrário de camadas finas de meio líquido, é que tecidos podem ser colocados em um volume suficiente de meio para impedir o esgotamento de nutrientes e permitir a dispersão de quaisquer toxinas que podem ser produzidas pelos tecidos de plantas, bem como aliviar problemas de hipóxia e hiper-hidricidade (quando potencial de água do meio é maior do que a da célula, e a água flui para dentro dela e o vacúolo torna-se distendido).

Ágar, Agarose, Goma gelana e vários outros produtos têm sido utilizados como agentes gelificantes.

##### **1.3.5.1 Ágar**

Segundo Stanley (1995), o ágar é um polissacarídeo membro das galactanas que ocorre como componente da matriz intercelular em numerosas algas marinhas vermelhas da classe das *Rhodophytas*. Consiste de cadeias lineares de (1→3)-beta-D-galactose e (1→4)-alfa-L-galactose alternadas. Muitas

dessas unidades são substituídas com grupos sulfato, metil e ácido pirúvico (GLICKSMAN, 1982).

Duas principais frações foram obtidas por Araki (1937), em ágar extraído de *Gelidium amansii*: a agarose – um polissacarídeo neutro capaz de formar geis fortes, e a agarpectina - um polímero sulfatado que dá ao ágar sua viscosidade. Posteriores estudos realizados por Duckworth e Yaphe (1971), indicaram, porém, que o ágar não é constituído destas duas frações apenas, mas compreende uma família de polissacarídeos que diferem entre si em sutis detalhes na estrutura.

O ágar é extraído a partir de espécies do gênero *Gelidium* e de outras algas vermelhas, retirados do mar em diferentes países. Ele varia de acordo com o país de origem, com o ano de coleta e com a maneira em que ele foi extraído e transformado. A proporção de agarose para polissacarídeos totais pode variar de 50 a 90% (ADRIAN; ASSOUMANI, 1983).

O ágar pode conter pequenas quantidades de macro e micro-elementos, em particular cálcio, sódio, potássio e fosfato (BERUTO *et al.*, 1995; DEBERGH, 1983; SCHERER *et al.*, 1988), hidratos de carbono, vestígios de aminoácidos e vitaminas (DAY, 1942) que afetam as características osmóticas e nutricionais de um gel. Elas também contêm substâncias fenólicas (SCHERER *et al.*, 1988) e os ágares de graus de pureza menor podem conter ácidos graxos de cadeia longa e inibidores para o crescimento de certas bactérias.

O ágar é amplamente empregado na preparação de meios de cultura semi-sólido. Ele tem certas vantagens que o tornaram tão amplamente utilizado para a cultura de tecidos vegetais, a saber:

a) formam géis com água que derretem a aproximadamente 100 ° C e solidificam a aproximadamente 45 ° C, e são, portanto, estáveis em todas as temperaturas de incubação viáveis;

b) os géis não são digeridos por enzimas de plantas;

c) ágar não reage fortemente com os constituintes do meio.

Para garantir o contato adequado entre o tecido e o meio, uma menor concentração de ágar é geralmente utilizada para as culturas vegetais do que para a cultura de bactérias. Meios para plantas não são firmemente gelificados, mas apenas feitos em estado semi-sólido. Dependendo da marca, concentrações entre 0,5-1,0% de ágar são geralmente utilizados para esta finalidade.

Embora seja o agente gelificante mais amplamente usado nos meios de cultura de tecidos de plantas, seu custo é relativamente alto e, em muitos estudos, diferentes respostas das plantas a tipos ou marcas de ágar têm sido relatadas. O ágar pode ser o componente mais caro dos meios de plantas, então há o interesse em minimizar a sua concentração.

#### 1.3.5.1.1 Agarose

A agarose é a fracção de elevada força de gel do ágar. É constituída por cadeias de polímeros de  $\beta$ -D (1 $\rightarrow$ 3) galactopiranosose e 3,6-anidro- $\alpha$ -L (1 $\rightarrow$ 4) galactopiranosose, de 20-160 unidades de monossacarídeos ligados alternadamente para formar hélices duplas. Existem também vários diferentes produtos agaro-pectina disponíveis, os quais têm sido extraídos a partir do ágar e tratados para remover a maioria dos grupos laterais de sulfato residuais (SHILLITO *et al.*, 1983).

Uma vez que sua preparação envolve adicionais processos, agarose é muito mais caro do que o ágar e seu uso só é garantido para culturas valiosas, incluindo protoplastos e cultura de anteras. Porém, há a vantagem de remover alguns componentes tóxicos do ágar durante sua preparação. (SHILLITO *et al.*, 1983).

Derivados de Agarose estão disponíveis, os quais fundem e gelificam em temperaturas inferiores a 30 ° C, tornando-os especialmente adequados para componentes termolábeis do meio de cultura, ou para a incorporação de protoplastos. Baixo Ponto de fusão da agarose é preparado através da introdução grupos hidroxietilo nas moléculas de agarose (SHILLITO *et al.*, 1983).

#### 1.3.5.2 Goma Gelana

A goma de gelana é um agente de gelificação amplamente utilizado em cultura de tecidos de planta, que é comercializado sob diversos tipos de nomes comerciais, incluindo Gelrite, Phytigel e Kelcogel. É um exopolissacarídeo que encapsula células da bactéria *Sphingomonas paucimobilis* (= *Auromonas Pseudomonas elodea* = *elodea*), a partir da qual é obtido por fermentação industrial. A estrutura, as propriedades físico-químicas e a reologia de soluções

de goma gelana e polissacáridos relacionados foi examinado por Banik *et al.* (2000).

A goma gelana consiste de uma repetição linear de tetrassacarídeo de D-glicose, D-glucurônico ácido, D-glucose e ramnose. Soluções aquecidas de goma gelana em soluções que contêm cátions, tais como  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , faz com que o polissacárido forme um gel em que os polímeros formam uma hélice dupla paralela meio-escalonada.

O polissacarídeo comercial desacetilado e purificado forma um gel não elástico firme. O gel define-se rapidamente a uma temperatura, determinada pelas concentrações de polissacárido e do cátion, que varia entre 35-50 °C (Kang *et al.*, 1982).

O produto comercial contém significativas quantidades de potássio, de sódio, de cálcio e magnésio (PASQUALETTO *et al.*, 1988; SCHERER *et al.*, 1988), mas é dito ser livre de impurezas orgânicas encontradas no ágar. Beruto *et al.* (1995) descobriram que 0,12% de Gelrite tem potencial matricial equivalente ao Bacto® Agar a 0,7%. Como a goma gelana é utilizada em concentração inferior ao ágar, o custo por litro de meio de cultura é menor.

Ela produz um gel transparente em que tecidos de planta podem ser mais facilmente visto e a contaminação microbiana mais facilmente detectada do que em geis de ágar.

Goma gelana provou ser um agente gelificante adequado para culturas de tecidos de muitas plantas herbáceas e existem relatos de seu uso bem sucedido para a cultura de calos, formação direta e indireta de órgãos adventícios e embriões somáticos, cultura de broto de herbáceas e espécies semi-lenhosas e enraizamento de mudas. Na maioria dos casos, os resultados têm sido tão bons quanto, e por vezes superiores, àqueles obtidos em meio solidificado com ágar (ANDERS *et al.*, 1988; KOETJE *et al.*, 1989).

Culturas de brotos, especialmente de algumas espécies lenhosas, são susceptíveis a tornarem-se hiperídricas se o Gelrite, assim como o ágar, for utilizado em uma concentração muito baixa. Há nítida diferença na resposta de diferentes espécies cultivadas em meio com Gelrite.

Nairn (1988) utilizou uma mistura de Gelrite (0,194%) e Difco Ágar 'Bacto' (0,024%) para evitar a hiper-hidricidade que ocorreu em culturas de brotos de *Pinus radiata* em meio gelificado apenas com 0,2% de Gelrite.

#### 1.3.5.3 Alginatos

O ácido algínico é um heteropolímero linear binário de ácido 1,4- $\beta$ -D-manurônico e ácido 1,4- $\alpha$ -L-gulurônico (LARKIN *et al.*, 1988). Extrai-se a partir de várias espécies de algas marrons. Quando sais de sódio são expostos a íons cálcio, a gelificação ocorre. Alginatos são amplamente utilizados para a cultura de protoplastos e no encapsulamento de sementes artificiais.

#### 1.3.5.4 Amido

Na busca de novos agentes gelificantes que diminuam os custos e tragam benefícios para a micropropagação de certas espécies vegetais, polissacarídeos como o amido, têm sido testados.

Sorvari (1986) descobriu que mudas foram formadas em frequências mais altas em culturas de anteras de cevada em um meio solidificado com 5% de amido de milho ou de cevada, em comparação com o ágar. O amido de milho formou apenas um gel fraco e foi necessário colocar um poliéster líquido na sua superfície para prevenir que os explantes afundassem. Sorvari (1986 b) constatou que demoraram de 5 a 14 semanas para brotações adventícias formarem-se em discos de batata em meio solidificado com ágar, mas apenas 3 semanas em meio contendo amido de cevada.

Certos autores mencionaram que o sucesso no uso do amido pode ser devido em parte, às características nutricionais que este polissacarídeo apresenta (CALLEBERG, JOHANSSON, 1993). Entretanto, existe um inconveniente, já que certas plantas liberam amilase *in vitro*, que degrada o amido, tornando o meio progressivamente mais líquido ao longo da incubação, além de ser mais opaco, o que dificulta a detecção de contaminantes e a observação de raízes e ainda apresenta sinerese. Muitas vezes, provoca a hiperhidricidade (ZIMMERMANN; BHARDWAJ, FORDHAM, 1995).

Henderson e Kinnersley (1988) constataram que calos embriogênicos de cenoura cresceram ligeiramente melhor em meios gelificados com 12% de amido



de milho do que em 0,9% de Difco Ágar 'Bacto', podendo baratear os custos do cultivo.

#### 1.3.5.5 "*Kappa*" Carragenana

Carragenana é um produto extraído de algas marinhas do gênero *Eucheuma* e a forma "kappa" tem fortes propriedades gelificantes. Tal como a goma gelana, "kappa" carragenana exige a presença de cátions para gelificação.

No meio de cultura de Linsmaier e Skoog (1965) com a carragenana a 0,6% p / v, a força do gel era ligeiramente menor do que a de 0,2% de Gelrite ou 0,8% de ágar extra puro (ICHI *et al.*, 1986).

#### 1.3.5.6 *Pectina*

A pectina é um polissacarídeo ramificado constituído principalmente de polímeros de ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose. Uma mistura de pectina e ágar podem ser um substituto mais barato para o ágar. Por exemplo, um meio semi-sólido, constituído por 0,2% de ágar e 0,8-1,0% de pectina, foi utilizado para a cultura de broto de morango e outras plantas (ZIMMERMAN, 1979).

#### 1.3.5.7 Outros Agentes Gelificantes

Battachary *et al.* (1994) descobriram que o sagu (de *Metroxylon sagu*) e o isubgol (de *Plantago ovata*) eram substitutos satisfatórios para o ágar em, respectivamente, 1/8 e 1/10 do custo do ágar puro A7921 comercializado pela Sigma.

Galactomananas vegetais também podem ser usadas como substitutos parciais de ágar em meios de cultura de tecidos (BAKER, CARROW, WOODMANSEE, 1949; DEUEL, NEUKON, 1954).

Em razão da utilização de galactomananas de sementes de *Adenanthera pavonina* nesse trabalho, um tópico separado para Galactomananas será feito a seguir, enfatizando seu possível papel como substituto parcial do ágar em meios de cultura para plantas.

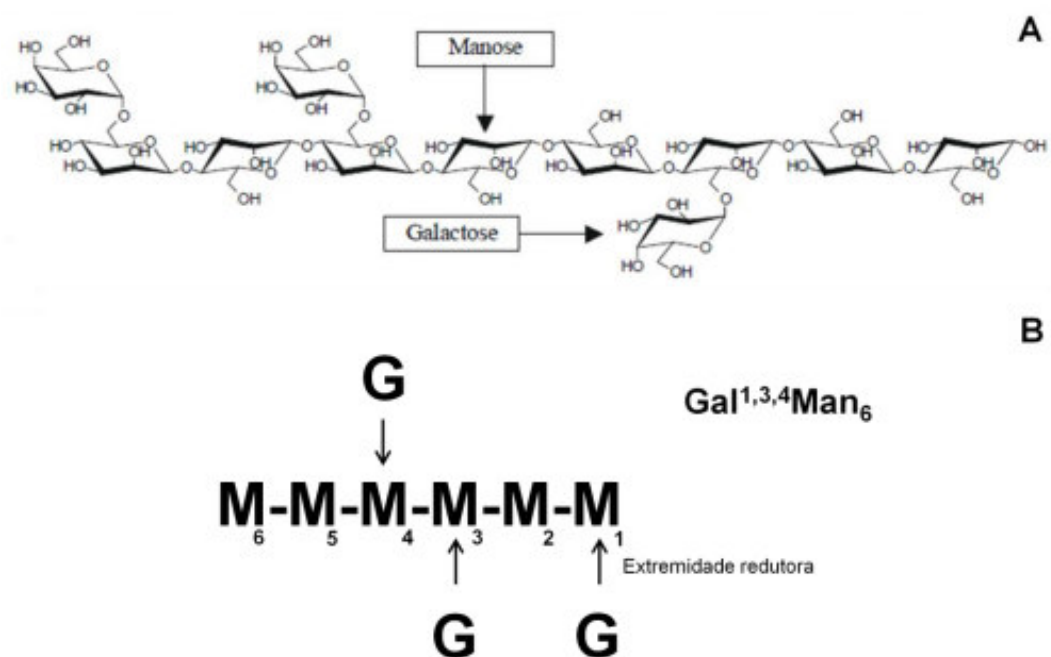
### 1.4 Galactomamanas

As galactomananas constituem o segundo maior grupo de polissacarídeos de armazenamento com respeito à sua distribuição no mundo vegetal (SHCHERBUKHIN, 1993), onde ocorrem como reserva polissacarídica de um grupo de plantas mucilaginosas ou plantas “gumosas”. São comumente encontradas no endosperma de sementes da família *Leguminosae* (REID, 1985). Em menor quantidade são encontradas em outras espécies da família *Palmae*, *Annonaceae*, *Convolvulaceae* e *Loganiaceae* (DEA, MORRISON, 1975; DEY, 1978), onde são utilizadas como reserva alimentícia durante a germinação e proteção contra a dessecação (EDWARDS *et al.*, 1989).

São uma família de polissacarídeos que apresentam como estrutura genérica (Figura 6) uma cadeia principal com unidades de beta-D-manopirranose com ligações (1→4), substituídas no carbono 6 por unidades de alfa-D-galactopirranose (DEA, MORRISON, 1975; DEY, 1978; SONI, BOSE, 1985). As galactomananas possuem alta capacidade de se ligar à água e formar soluções viscosas em altas diluições. Comparadas com o amido em base igual de massa, as soluções de galactomanana são cinco vezes mais viscosas (WHISTLER, SMART, 1953).

As razões molares entre manose:galactose podem ser diferentes, dependendo da fonte e do método de extração utilizado (DEA, MORRISON, 1975; LEITNER, 1991; REICHER *et al.*, 1991; ZAWADZKI-BAGGIO *et al.*, 1992; GANTER *et al.*, 1993; PETKOWICZ, 1993; LUCYSZYN, 1994; TAVARES, 1994; VARGAS-RECHIA *et al.*, 1995; PETKOWICZ *et al.*, 1998; GANTER, REICHER, 1999; PETKOWICZ *et al.*, 2001).

Figura 6 – Estrutura molecular das galactomananas. A) Cadeia principal linear de resíduos de D-manose unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, na qual resíduos de D-galactose estão unidos por ligações  $\alpha$ -1,6, formando ramificações simples. B) A cadeia principal de manose é numerada a partir da extremidade redutora (à direita). O número subscrito ligado a manose indica a quantidade de resíduos de manose que a cadeia principal do oligossacarídeo possui, enquanto o número subscrito ligado a galactose indica a posição do resíduo de galactose relativo aos resíduos de manose a partir da extremidade redutora.



Fonte: adaptada de Bukeridge *et al.* (2000).

A solubilidade em água depende do conteúdo de galactose substituinte na cadeia principal. As beta-mananas lineares puras, na ausência de ramificações de unidades de galactose, são completamente insolúveis em água (McCLEARY *et al.*, 1981).

O grau de substituição da cadeia principal de manose por unidades de galactose varia de 25 a 97%, com um alto grau de substituição ocorrendo em legumes mais filogenicamente avançados (EDWARDS *et al.*, 1989). A base para a sua vasta aplicação em uma grande variedade de produtos é a alta capacidade de ligar-se à água inibindo a sinerese, o seu grande poder espessante e a estabilidade de suas soluções.

Duas galactomananas são produzidas comercialmente em grandes quantidades: a Goma Guar a partir de sementes de *Cyamopsis tetragonolobus* e a Alfarroba a partir de sementes de *Ceratonia siliqua*. Outras gomas como a Tara e a Fenugreek obtidas de sementes de *Caesalpinia spinosa* e *Trigonella Foenum-graecum*, respectivamente, também são usadas em menores quantidades (GLICKSMAN, 1986; HERALD, 1986 a, b; MAIER *et al.*, 1993).

A importância deste polissacarídeo pode ser vista no seu amplo uso, principalmente em indústrias alimentícias (GLICKSMAN, 1979; NEUKON, 1989; DZIEZAK, 1991, WARD, ANDON, 1993; LUCYSZYN *et al.*, 2000), farmacêuticas

(WHISTLER, SMART, 1953), cosméticas (CHUDZIKOWSKI, 1971), como agente geleificante na obtenção de cápsulas de sementes artificiais (SORVARI *et al.*, 1997), anticoagulante (PIRES *et al.*, 2001), entre outros, incluindo seu uso, em combinação com ágar, como agente gelificante em meios de cultura de tecidos.

#### **1.4.1 Blendas ágar/galactomananas para cultura de tecidos vegetais e Propriedades Reológicas**

Para investigar as propriedades de interação de polissacarídeos, métodos reológicos têm sido de grande valia. Em linhas gerais, reologia é a ciência que estuda a deformação e o escoamento da matéria (LAPASIN e PRICL, 1995; BARNES; HUTTON e WALTERS, 1989). O termo foi introduzido por Eugene Cook Bingham a partir de suas publicações na década de vinte (BARNES; HUTTON e WALTERS, 1989). A preocupação com o aspecto de fluência da matéria remonta um passado distante e os anais da história da reologia registram como conceito primordial a observação de ser um material mais espesso do que outro, e assim mais resistente à fluência do que outro.

O comportamento reológico dos polímeros pode ser fortemente influenciado pela massa molecular, ramificações da cadeia polimérica, polaridade, copolimerização, mistura de polímeros (blendas), partículas sólidas suspensas, interações polímero-solvente e rigidez da cadeia (BARNES; HUTTON e WALTERS, 1989; SHAW, 1975). As moléculas ou partículas isoladas podem ligar-se por ligações cruzadas covalentes (valências primárias) e/ou associar-se por forças de atração de Van der Waals, e/ou associar-se simplesmente por emaranhamento mecânico (SHAW, 1975).

Os meios de cultivo semi-sólidos são uma mistura complexa de vários componentes, assim como acontece em géis alimentícios, onde as propriedades texturais são em princípio determinadas pelas propriedades estruturais combinadas do gel matriz e dos demais ingredientes (TOLSTOGUZOV, BRAUDO, 1983).

Segundo Ring e Stainsby (1982), estes ingredientes ou partículas acrescentadas podem ser classificados em ativos ou inativos, de acordo com seus efeitos nas propriedades reológicas. Uma partícula inativa tem pequena afinidade química pela matriz polimérica e não aumenta a força do gel. Em

contraste, uma partícula ativa normalmente tem uma forte interação com o gel matriz, o que acarreta em um aumento na força desse gel.

Géis são redes entumecidas possuindo propriedades coesivas de sólidos e propriedades de transporte difusivo dos líquidos. Elasticamente tendem a ser mais macios e, osmoticamente são altamente reativos (SILBERBERG, 1989). Um gel polimérico é geralmente uma solução na qual as cadeias são reticuladas de uma forma mais permanente que um mero emaranhado mecânico (BARNES; HUTTON e WALTERS, 1989).

É conhecido que propriedades de soluções de certos sistemas de biopolímeros podem ser modificadas pela adição de um segundo polímero na solução (DEA; BLANSHARD, MITCHEL, 1979; DEA, MORRISON, 1975; MORRIS, 1990). Um grande aumento na viscosidade ou até a formação de gel, em concentrações abaixo da qual isto ocorreria para um ou outro polímero em sistemas puros, poderá ser obtida.

Interações sinérgicas entre polissacarídeos são comercialmente atraentes e assunto de difundida exploração tecnológica (CAIRNS, MILES, BROWNSEY, 1987). Polímeros de custo elevado podem ser substituídos por uma mistura gelificante mais barata, e vários tipos de géis podem ser formados, dependendo da natureza dos componentes, da velocidade e extensão das misturas (MORRIS, MILES, 1986).

Um tipo de mistura onde são bem conhecidos os efeitos sinérgicos é aquele envolvendo certas galactomananas e galactanas componentes da família do ágar e carragenana (VIEBKE, PICULELL, 1992; TURQUOIS, TARAVEL, ROCHAS, 1993; TURQUOIS *et al.*, 1994). Baker *et al.* (1949) e Deuel e Neukon (1954) foram os primeiros a observar que misturas de galactomanana com carragenana ou ágar aumentam a força e a elasticidade desses frágeis géis.

O custo mais baixo das galactomananas, comparado com o ágar, e as suas interações sinérgicas aumentam a possibilidade de novas funcionalidades com grande importância industrial (DEA, MORRISON, 1975; HERALD, 1986 a, b; BAIARD, 1993; ZHAN *et al.*, 1993).

A extensão de sinergismo observado nas misturas de galactana/galactomanana é variável. Geralmente, condições que aumentam a tendência de galactana a se auto-agregar (mais baixo conteúdo de sulfato,

presença de certos sais), também aumenta suas propriedades de interação (MORRIS, 1990). Para as galactomananas, os efeitos sinérgicos dependem do grau e padrão de substituição da cadeia lateral (DEA, CLARK, 1986; DEA, 1987).

O primeiro mecanismo de gelatinização sinérgica elucidado para misturas galactomanana/galactana foi uma ligação da manose da cadeia principal da galactomanana com a dupla hélice da galactana (REES, 1972; DEA, McKINNON, REES, 1972). Esse modelo foi baseado em experimentos de agarose e kappa-carragenana misturadas com diversas galactomananas. Foi mostrado que, pela adição de galactomanana, a gelificação pode ser induzida abaixo da concentração normal de gelificação para as galactanas. Além disso, foi observado que galactanas com baixa massa molar, as quais normalmente não formariam um gel, gelificam ou precipitam quando galactomananas são acrescentadas ao sistema.

A sinérgica interação foi maior para as galactomananas menos substituídas, o que foi adotado como uma evidência de que a manose da cadeia principal estava envolvida na gelatinização. A ligação intermolecular entre a manose da cadeia principal e a dupla hélice da galactana foi posteriormente avaliada por Cairns. Miles e Brownsey (1987). Eles estudaram o modelo de difração de raio-X para a kappa-carragenana e furcellarana, sozinhas e em misturas com galactomananas.

Segundo Tako e Nakamura (1988), a interação sinérgica entre as moléculas de agarose e galactomanana de alfarroba pode ocorrer entre o átomo de oxigênio do anel da alfa-L-anidro anidro-galactose da agarose, e a hidroxila de C-2 da manose cadeia principal da molécula de galactomanana.

Em razão da utilização de galactomananas da espécie vegetal *Adenantha pavonina* nesse trabalho, uma breve descrição botânica será feita a seguir, bem como da planta se soja, que foi o modelo para cultura de tecidos utilizados para testar a blenda Ágar/Galactomanana.

### **1.5 Características botânicas das espécies *Adenantha pavonina* L. e *Glycine wightii***

A Carolina (*Adenantha pavonina*, L.), pertencente à família Leguminosae (*Fabaceae*) subfamília *Mimosoideae*, é uma planta nativa da Ásia e

África tropical, que foi transplantada para toda América tropical. No nordeste do Brasil se apresenta como árvore inerme e glabra de até 15 metros de altura e é empregada na arborização de parques e jardins. As folhas, pecioladas e paripinadas, apresentam de dois a cinco pares de pinas opostas, com seis a dez folíolos curtos e peciolados. Suas flores, amarelo-pálidas ou raramente brancas, dispõem-se em ráceros estreitos em forma de espiga. Suas vagens são compridas, estreitas, curvado-falconadas, com valvas que se enroscam na maturação lançando as sementes à curta distância (Figura 7) (BAILEY, 1954; BRAGA, 1976).

Figura 7 – Carol ou olho-de-pombo (*Adenanthera pavonina* L.): A) Porte arbóreo; B) Frutos deiscentes e C) Sementes



Fonte: <http://brazilplantseeds.com/index.php/adenanthera-pavonina-seeds.html>

A madeira pode ser usada na construção civil, marcenaria de luxo; as folhas são adstringentes, tônicas, anti-reumáticas e úteis contra diarreia e inflamação das mucosas (LUCYSZYN, 1994).

As sementes de *Adenanthera pavonina*, L. apresentam um tegumento vermelho brilhante e um endosperma gomoso e espesso. As dimensões médias (n=100) das sementes são 0,93 cm de comprimento; 0,90 de largura; 0,62 cm de espessura (TAVARES, 1998). As sementes possuem endospermas com alto teor de galactomananas, com uma relação de manose:galactose de aproximadamente 1,8:1 (TAVARES, 1998).

Já a *Glycine wightii* (Figura 8) é uma liana (trepadeira) perene, nativa do sul da África e do sudoeste da Ásia. No Brasil, esta planta é conhecida como “soja perene” (Silva *et al.*, 2003). Essa planta apresenta a seguinte classificação taxionômica: reino Plantae; divisão Magnoliophyta; classe Magnoliopsida; ordem Fabales; família Fabaceae; subfamília Faboideae; gênero *Glycine* (Willd, 1802); espécie *Glycine wightii* (Graham ex Wight et Arn) Verdc.

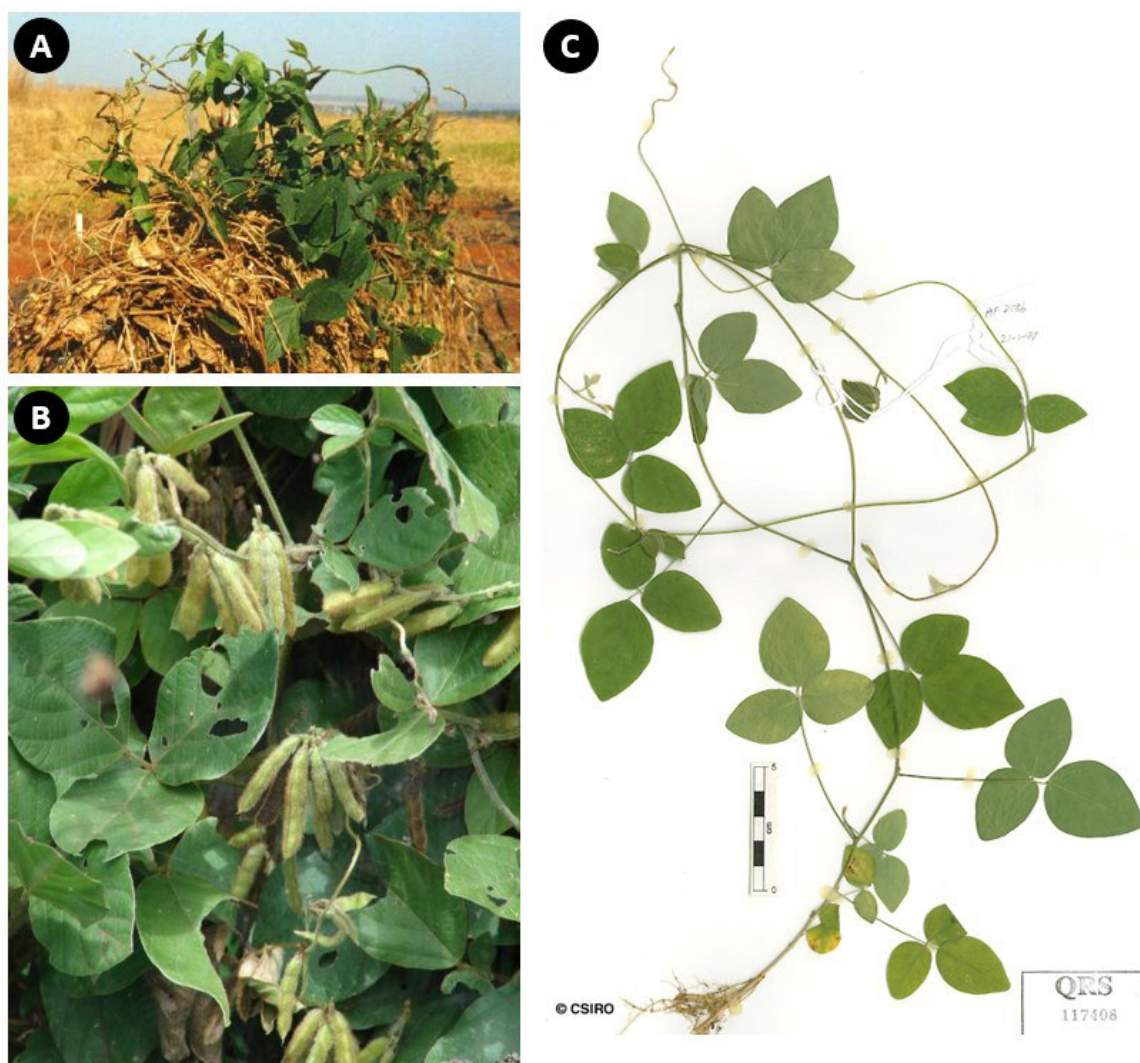
Com relação as características morfológicas, as plantas de *G. wightii* possuem pequenos e finos pêlos na parte inferior das folhas e caules, produzem flores de diferentes colorações em diferentes cultivares (branca, amarela, verde, laranja e rosa), apresentam vagens de 4 a 5 cm de comprimento, contendo aproximadamente 3 a 8 sementes de coloração marrom-escura (Figura 10). Segundo VISWANATHAN *et al.* (2001), estas sementes apresentaram alto teor de ácidos graxos insaturados, altas concentrações dos aminoácidos essenciais (lisina, leucina, isoleucina, valina, treonina e histidina), sendo ainda consideradas como fonte potencial de minerais, uma vez que é rica em potássio, magnésio, manganês, cobre e fósforo.

A soja-perene é comumente utilizada como fonte de alimento animal e humano. Na África, em algumas regiões, as folhas de soja-perene são cozidas e utilizadas na alimentação (HYMOWITZ, 1970). Algumas tribos da Tanzânia utilizam *G. wightii* não apenas como fonte de alimento, mas também como forragem, na produção de utensílios (ex: corda) e para fins medicinais, onde suas folhas são aplicadas na cura de feridas (BOER *et al.*, 2005). A soja-perene é utilizada no controle da erosão de vertentes, ao longo das margens de riachos e canais de irrigação. Também é utilizada em consórcio com outras culturas para eliminar plantas invasoras e para fertilizar solos impróprios. Por se tratar de uma fixadora de nitrogênio, ela aumenta o nível de nitrogênio dos solos, o que justifica sua aplicação fertilizadora (SKERMAN, 1998). Apresenta bom desenvolvimento



em áreas com índices pluviométricos entre 760 a 1800 mm por ano, crescendo pouco em condições de seca. A temperatura ideal para o seu crescimento e produção fica entre de 18 e 27° C, onde temperaturas muito baixas afetam o seu crescimento. O pH ideal dos solos para propiciar um bom cultivo desta espécie deve ser de 6-6,5 (SILVA, 2000).

Figura 8 – Soja-perene (*Glycine wightii*): A) Espécie trapadeira; B) Frutos em vagem e C) Exsicata com detalhes das folhas.



Fonte: <http://www.fao.org/ag/agp/agpc/doc/gallery/pictures/neowig.html>

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar a viabilidade técnica e econômica do uso da galactomanana extraída de sementes de sementes de *Adenanthera pavonina* L. como substituinte parcial do ágar em meios de cultura *in vitro* para indução de calos, a germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas, utilizando a soja-perene (*Glycine wightii*) como planta modelo.

### 2.2 Específicos

- Otimizar a extração e o processamento da galactomana de sementes de *A. pavonina*.
- Preparar meios de cultura modificados contendo diferentes combinações de ágar e galactomanana (blendas).
- Analisar qualitativamente as características das blendas (ágar/ galactomanana).
- Determinar as características reológicas das blendas (ágar/ galactomanana).
- Avaliar o padrão de difusão dos meios gelificados com as blendas.
- Avaliar o desempenho das blendas (ágar/ galactomanana) nos meios de cultura utilizados para indução/manutenção dos calos, germinação *in vitro* de sementes e desenvolvimento das plântulas, utilizando a soja-perene (*Glycine wightii*) como planta modelo.
- Avaliar a viabilidade econômica do uso da galactomanana de *A. pavonina* L. como substituinte parcial do ágar em meios de cultura.

### **3. MATERIAIS**

#### **3.1 Vegetal**

As sementes de *Adenanthera pavonina* L. (conhecida pelos nomes vulgares: Carolina ou Olho-de-pombo) foram coletadas no Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC). Já as sementes de *Glycine wightii* (Graham ex Wight & Arn) Verdc. foram coletadas na cidade de Brotas-SP. Após lavagem com água destilada e secagem à temperatura ambiente, as sementes das duas espécies foram devidamente selecionadas e acondicionadas em frascos de vidro, a temperatura de 25 °C, até a utilização posterior.

#### **3.2 Meios de cultura**

Sais (macro e micronutrientes) MS, vitaminas B5, ágar e sacarose da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA).

#### **3.3 Reguladores de crescimento**

Cinetina e ácido 2,4 – diclorofenoxiacético (2,4–D) foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA).

#### **3.4 Outros Reagentes**

Os demais reagentes foram utilizados em grau analítico.

## 4. MÉTODOS

### 4.1. Obtenção do endosperma bruto de sementes de *Adenanthera pavonina*.

Inicialmente, 100 g de sementes foram lavadas e submetidas a uma fervura em 400 mL de água destilada por 30 minutos. Visando aumentar o intumescimento, as sementes foram mantidas sob embebição em 400 mL de água destilada por mais 24 h, na geladeira (~ 8 °C). Em seguida, as sementes foram manualmente separadas nos seguintes componentes: tegumento, endosperma e embrião. Esses componentes foram isoladamente desidratados por meio da liofilização. O rendimento final do endosperma bruto foi calculado com base nos valores dos demais componentes liofilizados.

### 4.2. Processamento da goma endospérmica de *A. pavonina*.

Os endospermas brutos (10 g) de sementes de *A. pavonina* foram totalmente desidratados por liofilização. Em seguida, o material seco (denominada goma bruta) foi triturado em um multiprocessador, peneirado (30 mesh), homogeneizado e armazenado em frascos hermeticamente fechados até a sua posterior utilização.

### 4.3. Extração da galactomanana da goma endospérmica processada.

Após o processamento, 5 g da goma endospérmica de *A. pavonina* foi solubilizada em 200 mL de H<sub>2</sub>O destilada e deixar sob agitação por 15 h (*overnight*) a temperatura ambiente. Em seguida, o solubilizado foi centrifugado a 6000 x *g* por 30 min. O sobrenadante foi filtrado (filtro de nylon) e transferido para um béquer. O precipitado foi descartado. Álcool etílico foi adicionado ao sobrenadante (1:3 v/v) que foi mantido em repouso por 24 h á 10 °C. Após esse período, o álcool foi cuidadosamente removido por filtragem e centrifugação (6000 x *g* por 30 min). O precipitado foi novamente redissolvido em 100 mL de H<sub>2</sub>O destilada e mantido sob agitação por 15 h (*overnight*) a temperatura ambiente (25 °C). O material solubilizado (rico em galactomanana) foi centrifugado (a 10000 x *g* por 30 min). O sobrenadante foi transferido para um novo béquer e o precipitado descartado. Outro volume de álcool etílico foi adicionado ao sobrenadante conforme descrito anteriormente. Por fim, o álcool foi removido (por filtração ou

centrifugação) e a galactomanana precipitada foi desidratada com 50 mL de acetona P.A, liofilizada e acondicionadas em frascos hermeticamente fechados, a temperatura de 25 °C até a utilização posterior.

#### **4.4 Ensaio para preparação das blendas ágar/galactomanana de *A. pavanina*.**

Para avaliar o comportamento da galactomanana como agente geilificante, diferentes tratamentos utilizando blendas (misturas de polissacarídeos que interagem entre si) formuladas com ágar e galactomanana foram testados. As formulações utilizadas foram:

- a) Controle: ágar 1%;
- b) Tratamento 1: galactomanana 1 %
- c) Tratamento 2: ágar 0,9% + galactomanana 0,1%;
- d) Tratamento 3: ágar 0,7% + galactomanana 0,3%;
- e) Tratamento 4: ágar 0,5% + galactomanana 0,5%
- f) Tratamento 5: ágar 0,3% + galactomanana 0,7%;

Posterior ao preparo dos meios, diferentes frações da galactomanana foram previamente pesadas de cada tratamento foram dissolvidas em H<sub>2</sub>O destilada (30-40 mL), sob agitação (*overnight*). Após a completa dissolução da das frações de galactomanana, procedeu-se o acréscimo das frações de ágar e de água destilada (para atingir o volume final). Os meios preparados para as análises qualitativa, de difusão e reológicas continham somente água e as blendas dos tratamentos testados. Para cada tratamento foi preparado um volume de 60 mL de meio, o qual, após ajustado o pH (5,6) e autoclavado (15 minutos), foi distribuído em três placas de Petri (20 mL/placa). As placas foram vedadas e guardadas em câmara de crescimento, no escuro, por 24 horas. Foram realizadas análises qualitativas avaliando o tempo de gelificação, consistência e transparência dos meios.

#### **4.5 Análise reológica das blendas ágar/galactomanana**

Com o objetivo de analisar as propriedades viscoelásticas dos meios geilificados com as diferentes blendas testadas, medidas reológicas foram

realizadas num viscosímetro oscilatório rotacional (Reometro, modelo LVDV-III) 1 hora após a preparação das blendas.

Os resultados das análises de viscosidade plástica e de ponto de ruptura (*yield stress*) das blendas foram determinados utilizando o programa *Rheocalc* e com base na equação de Bingham ( $\tau = \tau_0 + \eta\dot{\gamma}$ ):

Onde:

$\eta$ , viscosidade (mPa.s)

$\tau$ , força de cisalhamento “shear stress” (Pa)

$\tau_0$ , ponto de ruptura “yield stress”

$\dot{\gamma}$ , taxa de cisalhamento “shear rate” (s<sup>-1</sup>)

As médias foram obtidas da medida de cinco repetições.

#### **4.6 Ensaio de difusão nos meios geilificados com as blendas ágar/galactomanana**

Para analisar a influência das blendas no processo de difusão dos componentes presentes no meio de cultura utilizado, uma alíquota (5  $\mu$ L) de solução de azul de metileno (5 g.L<sup>-1</sup>) foi aplicada no centro de placas de Petri contendo os meios geilificados com as diferentes blendas ágar/galactomanana.

A difusão do corante nos meios foi monitorada através pela medida do diâmetro do halo de difusão após diferentes intervalos de tempo (06, 12, 24, 36, 48 e 60 horas). O ensaio foi realizado a temperatura de  $28 \pm 2^\circ$  C e para cada tratamento foram utilizadas cinco repetições.

#### **4.7 Preparo dos explantes a partir de sementes de *Glycine wightii* germinadas**

As sementes de *G. wightii* são conhecidas por apresentarem um tegumento bastante duro, assim o embrião quase não absorve água por causa da resistência fornecida pelos tecidos que compõem esse tegumento, isso consequentemente resulta num alto percentual de dormência nestas sementes. Assim, as sementes foram submetidas a um tratamento de escarificação química, utilizando-se ácido sulfúrico P.A. Este tratamento teve a duração de 10 minutos, sendo seguido de sucessivas lavagens com água destilada estéril.

Após este tratamento inicial, fundamental para a hidratação adequada dos tecidos da semente e para o desencadeamento do processo germinativo, as

sementes foram colocadas em placas de Petri, com papéis filtro umedecidos com água destilada estéril. Em seguida, as placas com as respectivas sementes foram vedadas e colocadas em uma estufa tipo B.O.D., no escuro, por um período de 7 dias. Foram utilizadas 5 placas de Petri, com 20 sementes cada.

#### **4.8 Desinfestação de explantes de *G. wightii* visando o estabelecimento *in vitro* da calogênese**

Após a germinação, as sementes foram submetidas a um tratamento de desinfestação, necessário para a eliminação de patógenos exógenos (fungos e bactérias). Antes do tratamento, foram realizadas a retirada do tegumento das sementes e a separação dos explantes (cotilédones e hipocótilos), visando a obtenção de melhores resultados. Em seguida, os explantes foram imersos em solução contendo hipoclorito de sódio 2,5%, durante 10 minutos, seguido de três lavagens sucessivas com água destilada estéril, para remoção do excesso de hipoclorito e evitar danos aos tecidos vegetais.

#### **4.9 Indução de calos em explantes de *G. wightii***

Já desinfestados, os cotilédones e hipocótilos foram cortados transversalmente, com auxílio de pinça e bisturi estéreis, em partes com tamanhos aproximadamente iguais ( $18 \pm 2$  mm). Com o objetivo de obter a produção de calos *in vitro*, foi selecionado um meio de cultura ideal para este propósito. O meio utilizado foi o elaborado por Murashige e Skoog (1962), conhecido como meio MS, suplementado com sacarose (fonte de carbono), 2,4-D e cinetina (fitorreguladores), e ágar (agente gelificante) nas respectivas concentrações: 3%, 1 mg/L, 0,1 mg/L e 0,8% . De acordo com a metodologia descrita por Silva (2003), estas são as concentrações ideais para a obtenção de calos a partir de explantes (cotilédone e hipocótilo) de *G. wightii*. Após o preparo, ajuste do pH (5,6) e autoclavagem (15 minutos), o meio de cultura foi distribuído em cinco placas de Petri, 25 mL por placa. Em seguida, os explantes previamente seccionados e desinfestados foram transferidos para as placas de Petri contendo o meio, cada placa contendo seis explantes. Os explantes de cotilédone foram colocados com sua parte abaxial em contato com o meio, e os explantes de hipocótilo foram colocados no sentido vertical, a fim de facilitar a absorção dos

nutrientes, reguladores de crescimento e a conseqüente formação de calos. Em seguida, as placas foram vedadas e colocadas em câmara de crescimento (no escuro) a uma temperatura de aproximadamente  $28 \pm 2$  °C, por um período de 6-7 semanas, tempo necessário para o início da calogênese e para um bom desenvolvimento dos calos.

#### **4.10 Manutenção e estabilização da cultura de calos de *G. wightii***

Após algumas semanas de desenvolvimento, os calos obtidos a partir de cotilédones e hipocótilos de *G. wightii* foram transferidos para outras placas contendo meio de cultura novo. Conhecidas como subcultivos, estas etapas têm por finalidade promover a manutenção e a estabilização da cultura de calos, permitindo o uso posterior desta sem prejuízo ao material original. O subcultivo caracteriza-se pela fragmentação do calo inicial em pequenos pedaços de tamanho homogêneo, seguido da transferência destes explantes para um meio de cultura novo. Desta forma, estes calos podem iniciar um novo ciclo de crescimento, desenvolvendo-se e alcançando tamanhos iguais ou superiores aos dos calos originais. Os calos obtidos a partir de cotilédones e hipocótilos de *G. wightii* foram repicados, produzindo fragmentos (pequenos calos) que foram transferidos para placas contendo meio de cultura novo, idêntico ao anterior. Em seguida, estas placas foram colocadas em câmara de crescimento (no escuro) a uma temperatura de aproximadamente  $28 \pm 2$ ° C, por um período de quatro a cinco semanas.

#### **4.11 Efeito das blendas no desenvolvimento dos calos de *G. wightii* cultivados em meio MS**

Com o objetivo de testar a influência das blendas sobre o desenvolvimento dos calos de *G. wightii*, os calos obtidos a partir da cultura de cotilédones e hipocótilos foram submetidos a um subcultivo, originando novos explantes (calos menores, de tamanho uniforme). Estes calos foram distribuídos em placas de Petri contendo meio MS (pH 5,6) suplementado com sacarose (3%), 2,4 – D (1 mg/L) e cinetina (0,1 mg/L). Foram testados os seguintes geilificantes:

- Controle: ágar 1%;
- Blenda 1: ágar 0,7% + galactomanana 0,3%;



- Blenda 2: ágar 0,5% + galactomanana 0,5%.

Foram utilizadas cinco placas para cada meio (cinco calos/placa), cada uma contendo 25 mL de meio. Em seguida, estas placas foram vedadas e mantidas em câmara de crescimento (no escuro) a uma temperatura de aproximadamente  $28 \pm 2$  °C. O padrão de desenvolvimento dos calos cultivados nos meios contendo as blendas selecionadas foi acompanhado através do estabelecimento de uma curva de crescimento, tomando-se como base às medidas de peso fresco e peso seco destes calos. Para realizar as medições, foram retiradas três placas a cada quatro dias (0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 e 32 dias). Para cada placa, os calos foram coletados, pesados, liofilizados e pesados novamente após a desidratação. Valores foram registrados e as médias foram calculadas utilizando o programa *ESTATpro*.

#### **4.12 Germinação *in vitro* de sementes de *G. wightii* em meios de cultura contendo as blendas ágar/galactomanana e avaliação das plântulas**

A germinação *in vitro* de sementes vem sendo utilizada há muito tempo nas técnicas de cultura de tecidos vegetais. Trata-se da transferência de sementes previamente desinfestadas para frascos, placas de Petri ou tubos de ensaio contendo um meio de cultura apropriado, que pode variar de acordo com o objetivo a ser alcançado. Após a germinação, a plântula pode ser transferida para outro meio, diferente do inicial, no intuito de mudar as características do meio e as respostas morfológicas do vegetal. O experimento de germinação *in vitro* de sementes de *G. wightii* foi realizado em tubos de cultura contendo os seguintes meios:

- Controle: Ácido giberélico (GA<sub>1</sub>) + ágar 1%;
- Meio 1: Ácido giberélico (GA<sub>1</sub>) + ágar 0,7% + galactomanana 0,3%;
- Meio 2: Ácido giberélico (GA<sub>1</sub>) + ágar 0,5% + galactomanana 0,5%.

Para cada meio testado foram utilizadas dez repetições, com tubos de cultura contendo 6 mL de meio cada. As sementes foram previamente escarificadas com ácido sulfúrico P.A. durante 10 minutos, sendo posteriormente lavadas com água destilada estéril (3X) e secadas em papel filtro estéril. Com uma pinça estéril, as sementes foram transferidas para os tubos de ensaio (uma por tubo), sendo este vedado com uma tampa estéril (feita de algodão e gaze

cirúrgica) e papel alumínio estéril. O experimento teve duração de 12 dias, e avaliações das taxas de germinação e do comprimento da plântula (base-ápice) foram realizadas a cada três dias.

#### **4.13 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa computacional *ESTATpro* desenvolvido pelo Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A maioria dos meios sólidos ou semi-sólidos usados para o cultivo *in vitro* de tecidos vegetais utiliza ágar como agente polimerizante, principalmente devido às suas convenientes propriedades gelificantes e estabilidade durante a cultura (GONÇALVES, ROMANO, 2007; LUCYSZYN *et al.*, 2007). No entanto, outros polímeros também estão sendo usados com melhores resultados que o ágar em algumas culturas. Entre esses estão as gomas do tipo “gelan”, produzidas por bactérias (*Pseudomonas sp.*). Essas gomas são polissacarídeos de ácido glucurônico, ramnose e glucose, com grupos O-acetil (DAS *et al.*, 2015).

A escolha do tipo de polissacarídeo ou misturas (blendas) a ser utilizado como agente gelificante do meio é um fator determinante para o êxito do cultivo, pois o mesmo poderá afetar de forma positiva ou negativa o desenvolvimento *in vitro* da cultura (IVANOVA, VAN STADEN, 2011). O meio deve ser firme o bastante para suportar os explantes, mas, se a rigidez for muito alta, este pode não permitir o contato adequado entre o meio e o material vegetal (BERRIOS *et al.*, 1999). Além disso, a reação de uma determinada planta ao tipo de agente gelificante é fortemente dependente do tipo de cultura e da espécie vegetal utilizada (SCHOLTEN, PIERIK, 1998).

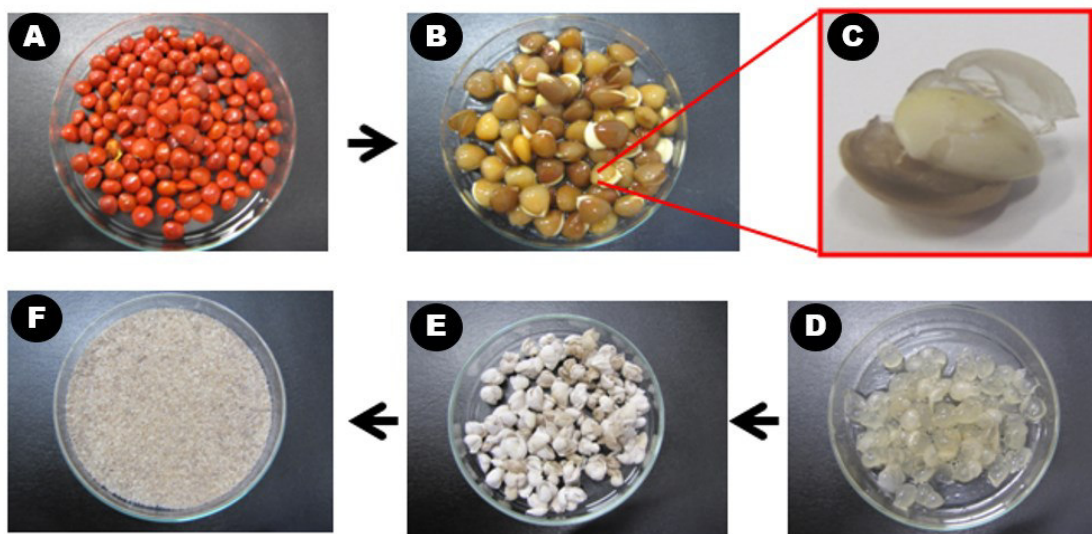
Estudos demonstraram que os problemas mais comuns relacionados ao tipo de ágar ou blenda são hiperhidricidade, oxidação e necrose dos tecidos (KEVERS *et al.*, 2004). Além disso, o ágar é considerado a principal fonte de variações presente nos meios de cultivo *in vitro* (DAS *et al.*, 2015). Diferentes hipóteses têm sido levantadas para justificar esta influência do ágar sobre as culturas *in vitro*, dentre elas a presença de inibidores e contaminantes (NAIRN *et al.*, 1995), influência na velocidade de difusão dos componentes do meio e de água para os explantes e variações na disponibilidade de água (GANESAN *et al.*, 2015). Por essas razões e, devido ao elevado preço do ágar utilizado nos ensaios de cultura de tecidos, diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar alternativas viáveis para amenizar ou solucionar esses problemas.

Recentemente, pesquisas demonstraram experimentalmente que outros polímeros (de origem vegetal) podem ser utilizados como substitutos totais ou

parciais (na forma de blendas) do ágar, nos meios de cultura destinados aos processos de micropropagação e calogênese.

De acordo com os resultados obtidos no nosso trabalho, a extração da goma bruta (Figura 9) de sementes de *A. pavonina* apresentou um rendimento de aproximadamente  $87 \pm 0,3\%$  (Figura 9). Esse resultado é bem satisfatório quando comparado a resultados de extração de outras gomas vegetais, como por exemplo, a *locust bean gum* (LBG). Dakia *et al.* (2008) obtiveram um rendimento de 43 % do peso total das sementes, no processo da LBG.

Figura 9 – Extração e processamento da goma endospermica de *Adenanthera pavonina* para obtenção de galactomanana. A) Sementes integras e lavadas; B) Sementes após a fervuras em H<sub>2</sub>O destiladas; C) Goma envolvendo o endosperma; D) Goma endospermica removida manualmente; E) Goma endospermica liofilizada e F) Goma endospermica processada (denominada Goma bruta)



Após as etapas de extração e processamento, a goma bruta foi utilizada para extração da galactomanana. Foi obtido um rendimento de 0,92 g de galactomanana por grama da goma bruta, ou seja, um rendimento de 92%. Após a liofilização e processamento a galactomanana apresentou um alto grau de pureza e uniformidade de cor e das partículas (Figura 10)

Fig. 10 – Galactomanana processada de *Adenanthera pavonina*



De acordo com a análise qualitativa das características dos meios, os melhores resultados foram obtidos nos tratamentos 2 (ágar 0,9% + galactomanana 0,1%), 3 (ágar 0,7% + galactomanana 0,3%;) e 4 (ágar 0,5% + galactomanana 0,5%) (Tabela 2). Estas blends proporcionaram uma boa solidificação do meio, necessária para a sustentação adequada dos explantes, além de apresentarem homogeneidade e transparência bem similares aos do controle (ágar 1 %). Já os meios contendo os tratamentos 1 (galactomanana 1%) e 5 (ágar 0,3% + galactomanana 0,7%) apresentaram resultados insatisfatórios, pois não foram capazes de solidificar os meios, já que, sozinhas, as galactomananas não são capazes de formarem géis sólidos (LUCYSZYN *et al.* 2007). Assim o uso da galactomanana de *A. pavonina* como agente gelificante exclusivo não foi possível, uma vez que o meio ficou fracamente solidificado, não proporcionando a resistência mínima necessária para suportar os explantes em sua superfície. Para aumentar a solidificação do meio, foi necessário combinar a galactomanana com o ágar formando assim, as blends. Estratégias semelhantes foram adotadas para aumentar a consistência do meio gelificado com amido, utilizando-se ágar, agarose e gelrite (ZIMMERMAN *et al.*, 1995; JAIN, BABBAR, 2002), e na obtenção da melhor razão ágar. A figura 11 mostra a blenda obtida no tratamento 4 (ágar 0,5% + galactomanana 0,5%) em comparação ao tratamento controle (ágar 1%).

Tabela 2 – Análise qualitativa das características dos meios gelificados com as blendas ágar/ galactomanana de *A. pavonina*.

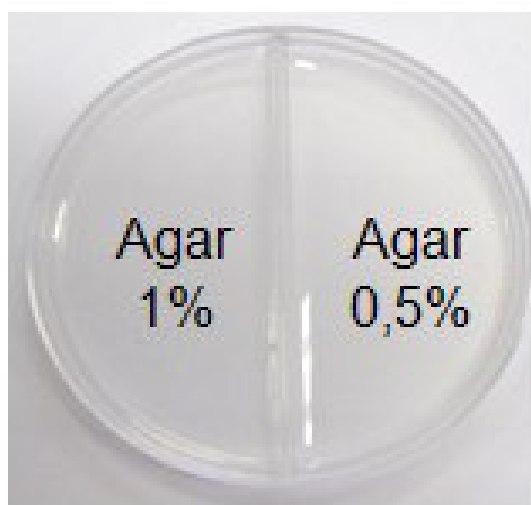
Tratamentos	Ágar: Galactomanana (%, p/p)	Solidificação <sup>a</sup>	Tempo de solidificação <sup>b</sup> (min)	Transparência
Controle	1,0	Alta	5	Alta
T1	1,0	Ausente	*	Média
T2	0,9 : 0,1	Alta	5	Alta
T3	0,7 : 0,3	Alta	7	Alta
T4	0,5 : 0,5	Alta	8	Média
T5	0,3 : 0,7	Muito baixa	10	Baixa

<sup>a</sup>Avaliada pela agitação das manual da placas de Petri

<sup>b</sup>Solidificação a temperatura ambiente (25 °C)

\*Não solidificou

Fig. 11 – Meios gelificados com ágar 1% e a blenda ágar 0,5% + galactomanana 0,5%



O estudo dos parâmetros reológicos das blendas revelou que as melhores interações, em termos de resistência do gel, ocorreram nos meios gelificados com os tratamentos 2, 3 e 4 (Tabela 3). Esses meios apresentaram valores de viscosidade plástica e de ponto de ruptura relativamente próximos aos obtidos no

tratamento controle, porém um pouco menores. Este padrão de resultado assemelha-se ao obtido por Lucyszyn (2004), o qual sugere que esta pequena diminuição da viscosidade plástica e do ponto de ruptura representa que géis menos rígidos foram obtidos, o que pode ser uma vantagem na difusão dos nutrientes no meio de cultura. Os resultados do presente trabalho fornecem evidências da existência de um efeito sinérgico, devido a forte e eficiente interação entre o ágar e as galactomanas. Os tratamentos 1 e 5 resultaram em meios frágeis e de baixa resistência. Isto sugere que nessas combinações poucas ligações intermoleculares foram formadas entre esses polímeros, embora estas são suficientes para que os meios continuem parcialmente sólidos quando em estado estacionário. Porém, quando foram submetidos uma tensão mínima (aplicada ao sistema), os meios referentes a estes tratamentos sofreram ruptura, representada pelos baixos valores dos parâmetros analisados. O tratamento 1 (contendo somente galactomanana) apresentou os mais baixos valores, devido à baixa capacidade da galactomanana de formar, sozinha, um gel sólido, devido à sua estrutura. Estes resultados são similares aos obtidos por Lima-Nishimura *et al.* (2003), quando analisaram os parâmetros reológicos de blendas obtidas com ágar/ xiloglucana de jatobá e utilizadas em meios para micropropagação.

Tabela 3 – Análise reológica dos meios de cultura gelificados somente com ágar e com as blendas de ágar/ galactomanana de sementes de *A. pavonina*

Tratamentos	Ágar / Galactomanana (%, p/p)	Viscosidade plástica (mPa)*	Ponto de ruptura (N.m <sup>-2</sup> )*
Controle	1,0	12.856 ± 42	9,7 ± 0,04
T1	1,0	110,4 ± 09	0,1 ± 0,03
T2	0,9 : 0,1	12.572 ± 38	8,5 ± 0,06
T3	0,7 : 0,3	11.871 ± 20	7,7 ± 0,08
T4	0,5 : 0,5	9.710 ± 31	6,8 ± 0,02
T5	0,3 : 0,7	4.311 ± 17	3,0 ± 0,02

\* Valor médio e desvio padrão de 5 repetições

As interações sinérgicas entre polissacarídeos são comercialmente atraentes e assunto de várias pesquisas tecnológicas (WU *et al.*, 2009). No entanto, alguns fatores afetam a magnitude da sinergia entre sistemas

poliméricos, incluindo o peso molecular e a viscosidade intrínseca (FERNANDES, GONÇALVES, DOUBLIER, 1991), a concentração de sais (KHOURYIEH *et al.*, 2007), a proporção de cada polissacarídeo utilizada na mistura (CUI *et al.*, 1995), a concentração total de polissacarídeos (BRESOLIN *et al.*, 1997), a temperatura (ZHAN *et al.*, 1993) e o pH (WHITNEY; *et al.*, 1998).

Existem na literatura, muitos artigos relacionados à sinergia que ocorre entre diferentes blendas de polissacarídeos (BRESOLIN, 2006; NORZIAH, FOO, KARIM, 2006). A interação entre os polissacarídeos ágar e galactomanana de alfarroba foi avaliada por análises reológicas e por RMN. A interação sinérgica entre esses dois polissacarídeos foi caracterizada pela formação de zonas de junção entre o ágar e a galactomanana em regiões deste polissacarídeo não substituídas por unidades de galactose. Também foi observado que, em concentrações elevadas de ambos, as moléculas de galactomanana se auto associam, levando a uma separação de fase formando uma rede interpenetrante (TURQUOIS, TARAVEL, ROCHAS, 1993). A utilização de um único polissacarídeo, muitas vezes resulta na formação de gel com baixa coesão, aparência não apreciável, curta durabilidade, alta sinerese, e estabilidade inadequada para serem submetidos a processos industriais e condições ambientais diversas (LUCYSZYN *et al.*, 2007). Assim, blendas formadas com dois ou mais biopolímeros vêm sendo amplamente investigados, entre os exemplos incluem-se: a carragenana e micelas de caseína (JI *et al.*, 2008), ágar e carragenana (MEENA *et al.*, 2009), amido e pectina (KHONDKARA *et al.* 2006), ágar e galactomanana (LUCYSZYN *et al.*, 2006), galactomanana e xantana (SHOBHA, THARANATHAN, 2009), pectina e galactomanana (WU *et al.*, 2009), pectina e xiloglucana (ITOH *et al.*, 2008).

Em virtude, da eficiência do sinergismo observado, resultando numa maior possibilidade de substituição do ágar e consequentemente, uma redução de custos, os tratamentos 3 e 4 foram escolhidos para os demais etapas deste trabalho. Os meios contendo tais blendas foram mantidos por até 30 dias na geladeira (5 °C), sem perder suas características de gel sólido.

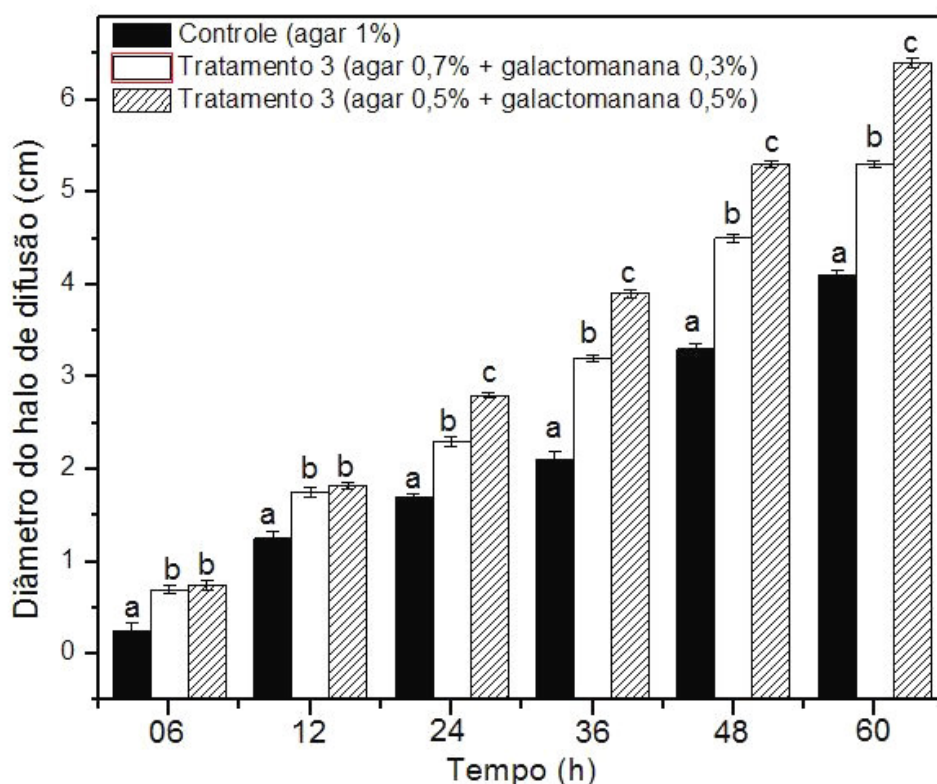
O gráfico 1 mostra a difusão do corante azul de metileno nos meios gelificados com as blendas dos tratamentos 3 e 4. Ambos os meios não apresentaram diferenças significantes até o tempo de 12 horas. No entanto, a



difusão do corante foi significativamente mais rápida nesses meios com relação a difusão no meio controle. Após 12 horas, observou-se um aumento significativo da difusão do corante nos meios testado. Porém, esta difusão foi tornando-se cada vez mais lenta no meio com o tratamento 3 e, ao final do experimento, apresentou uma significativa diferença com relação ao meio com o tratamento 4. Os meios contendo o tratamento 4 apresentaram a maior difusão, quando comparados aos meios dos tratamentos 3 e ao controle. Meios gelificados somente com o ágar 1% apresentaram uma difusão significativamente lenta quando comparado aos demais. Estes resultados concordam com os estudos desenvolvidos por Ackeers e Steere (1962), que mostraram que a separação e a difusão de um determinado soluto diminuem com aumento do tamanho das partículas deste soluto e/ou com o aumento da resistência do gel, o que corrobora com a afirmação dada anteriormente de que géis menos rígidos foram obtidos neste trabalho. Baseado nisso, os resultados aqui obtidos, fornecem indícios de que tanto a água como outros componentes presentes no meio poderão se difundir melhor nos meios com a blenda do tratamento 4, do que nos meios gelificados com a blenda do tratamento 3 ou somente com o ágar.

As propriedades físicas e químicas das blendas podem proporcionar uma melhor difusão dos nutrientes do meio para os tecidos vegetais, permitindo assim um melhor desenvolvimento *in vitro* da cultura. No entanto, um meio cuja matriz do gel é muito rígida deverá reduzir a viabilidade de água e de sais minerais para o explante, afetando de forma irreversível o desenvolvimento da cultura (BERUTO *et al.*, 1995).

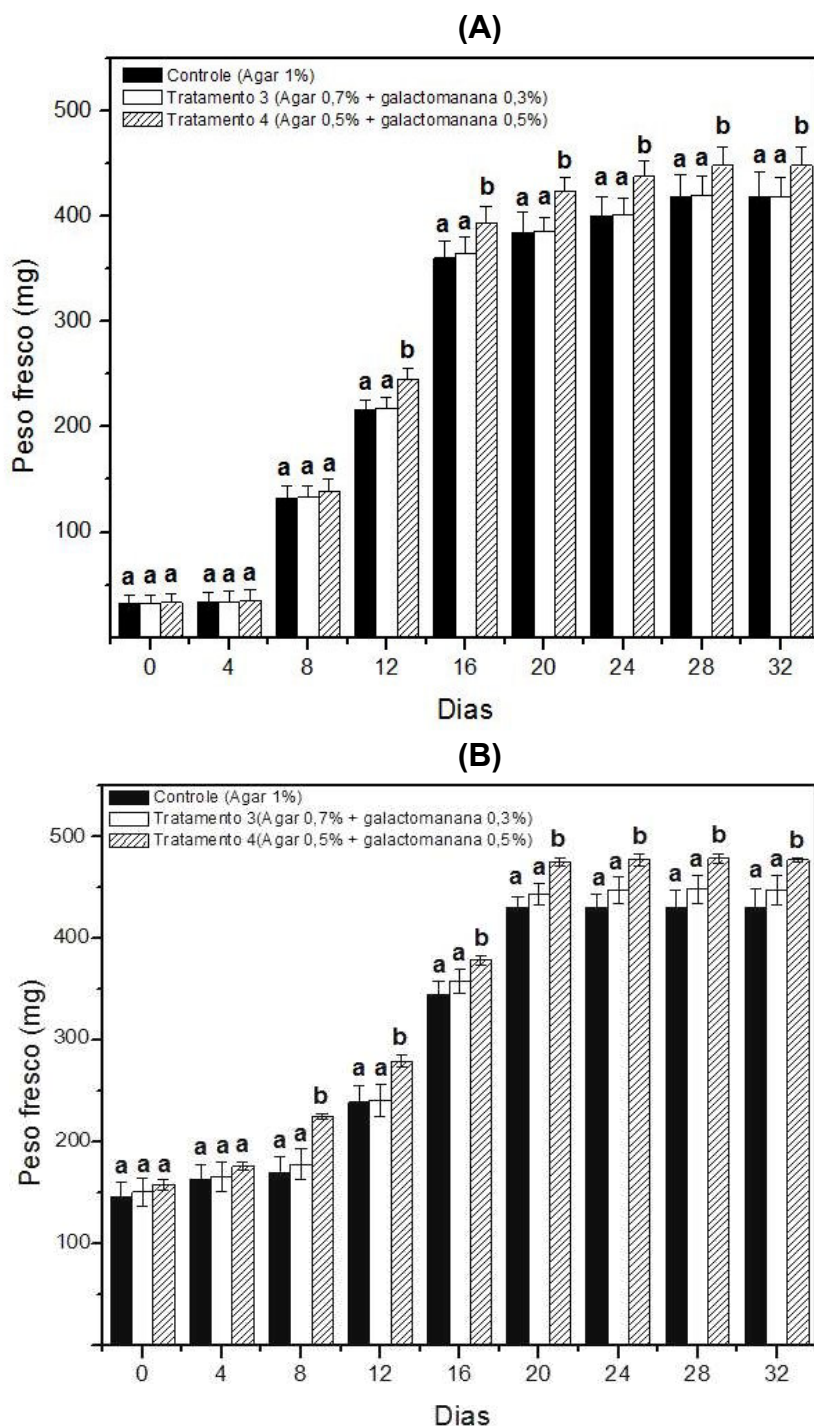
Gráfico 1 – Difusão do azul de metileno em meios gelificados com ágar (1%) e com as blendas dos tratamentos 3 e 4. As medidas do diâmetro dos halos de difusão foram realizadas nos intervalos de 06, 12, 24, 36, 48 e 60 horas. Cada ponto representa a média e o desvio padrão de 5 repetições. Esse ensaio foi conduzido a temperatura ambiente (25 °C)



A eficiência do meio MS gelificado com as blendas dos tratamentos 3 e 4 na manutenção e no desenvolvimento dos calos de *G. wightii* também foi avaliada. Silva *et al.* (2003) demonstraram que o meio MS suplementado com 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina; 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 3% de sacarose e ágar 1% é ideal tanto para a indução quanto para a manutenção de calos oriundos de cotilédones e hipocótilos de *G. wightii*. Os calos (de cotilédones e hipocótilos) de *G. wightii* utilizando essa composição de meio são friáveis e livres de oxidação. Os autores também demonstraram que o desenvolvimento desses calos apresenta cinco fases distintas, apresentando uma curva de crescimento com padrão sigmoidal.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que até o 4º. dia de experimento não houve nenhuma diferença no padrão de crescimento dos calos cotiledonares (Gráfico 2A) e de hipocótilos (Gráfico 2B) cultivados nos meios gelificados com as blendas dos tratamentos 3 e 4, em relação ao controle.

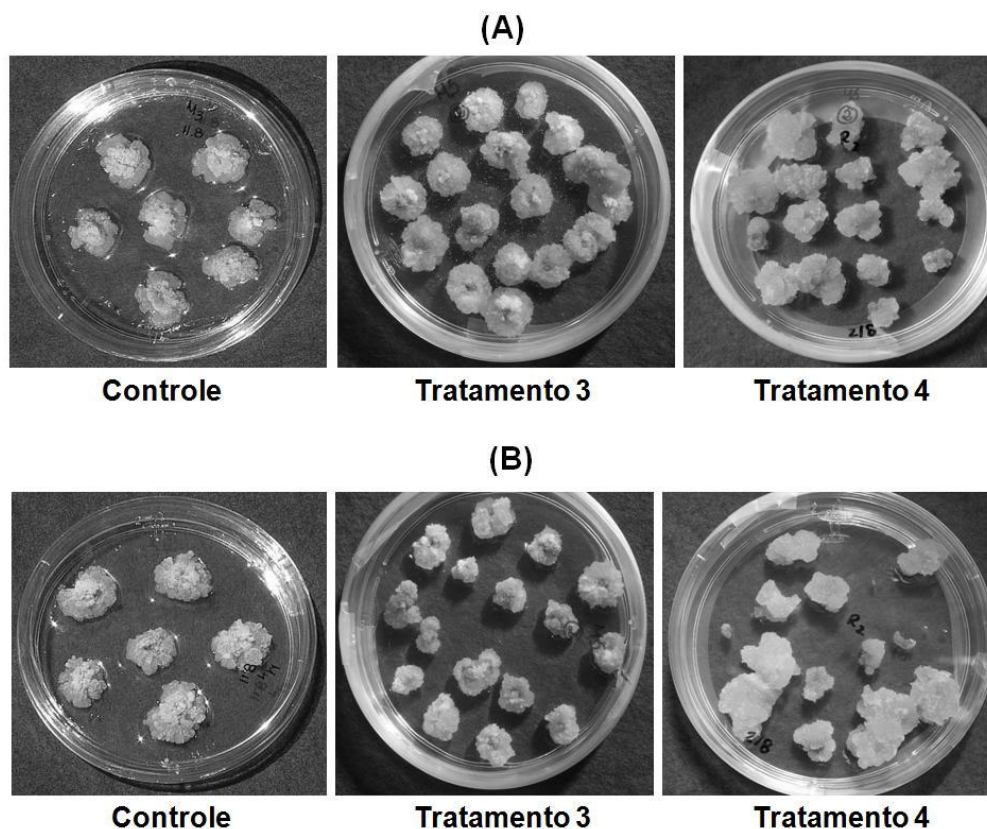
Gráfico 2 – Efeito das blendas dos tratamentos 3 e 4 no desenvolvimento dos calos de cotilédones (A) e hipocótilos (B) de *G. wightii* em meio MS. Cada valor representa a média e o desvio padrão de três repetições. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



Segundo Dodds e Roberts (1995), pode-se distinguir no crescimento dos calos cinco diferentes fases, bem como os eventos metabólicos que lhes são peculiares. A primeira fase (denominada fase lag) consiste de um período de

adaptação das células dos calos ao meio e o início de absorção de nutrientes, o que explica o crescimento relativamente lento dos calos de *G. wightii* nos meios testados até o quarto dia. Tanto os calos cotilédonários (Gráfico 2A) quanto os de hipocótilos (Gráfico 2B) cultivados no meio com a blenda do tratamento 3 apresentaram um padrão de crescimento similar aos calos cultivados no meio controle. Porém, os calos cultivados no meio com a blenda do tratamento 4 apresentaram um padrão de crescimento significativamente superior aos demais meios testados (Figura 12), possivelmente influenciados pela maior quantidade de galactomanana presente no meio.

Figura 12 – Calos de cotilédones (A) e hipocótilos (B) de *G. wightii* cultivados em meios MS gelificados com as blendas dos tratamentos 3 (ágar 0,7% + galactomanana 0,3%) e 4 (ágar 0,5% + galactomanana 0,5%). O meio MS gelificado com ágar 0,8% foi usado como controle.



Estes resultados podem estar relacionados à natureza neutra das xiloglucanas, à ausência ou redução da quantidade de íons presentes no meio (contaminantes) e aos parâmetros físicos dos géis, uma vez que meios mais

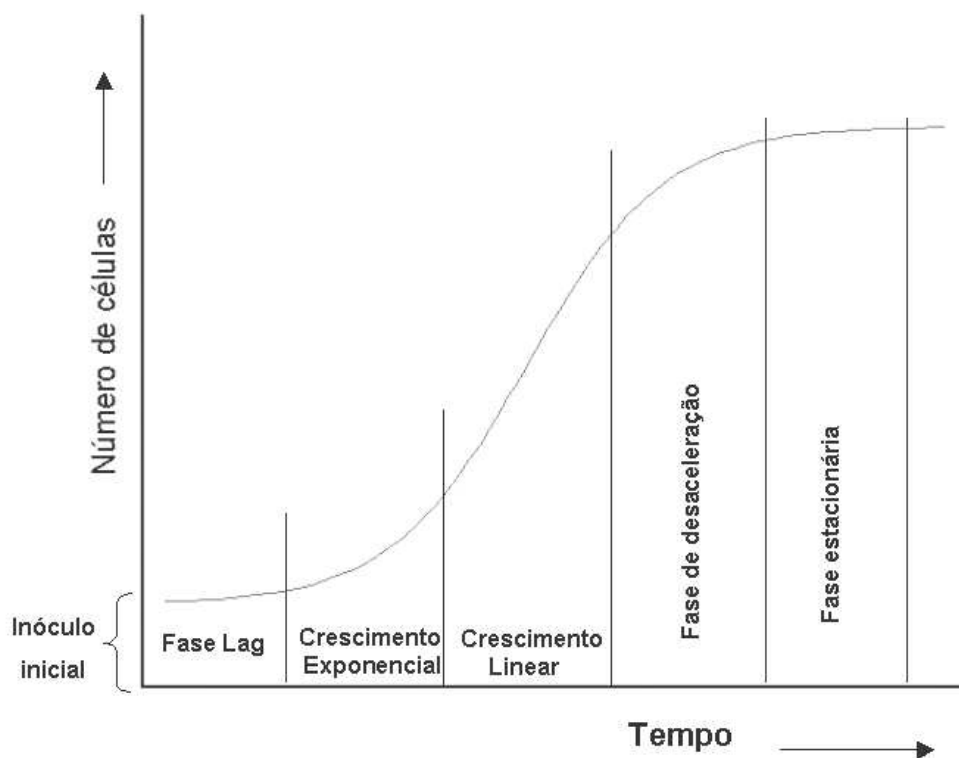
viscoelásticos foram obtidos quando o ágar foi combinado com as galactomanas. A formação deste gel facilitou a difusão de água, nutrientes e reguladores de crescimento do meio para os explantes, proporcionando uma melhor absorção e, conseqüentemente, melhor indução da calogênese. Além disso, a ação das galactomanas como fonte de energia pode ter sido fundamental para o processo de calogênese. Apesar de ser uma excelente agente gelificante, o ágar é pouco utilizado com fonte de carbono nos cultivos *in vitro*. Contrariamente, as galactomanas podem funcionar como uma fonte mais rica de energia, pois a própria estrutura desses polissacarídeos favorece a assimilação do carbono das cadeias laterais pelas células vegetais (LIMA *et al.*, 1993). Isso pode explicar o melhor crescimento dos calos cultivados nos meios gelificados com a blenda do tratamento 4.

É importante destacar que os calos cultivados nos meios contendo as blendas em estudo não apresentaram sintomas de hiperhidricidade. Os cultivos *in vitro* são frequentemente prejudicados por um fenômeno conhecido hiperhidricidade (PALMA *et al.*, 2011). Este fenômeno geralmente está relacionado com o tipo e a quantidade do agente gelificante utilizado no meio de cultura (FRANCK *et al.*, 1998).

Conforme citado anteriormente pode-se distinguir cinco diferentes fases no crescimento dos calos, bem como os eventos metabólicos que lhes são peculiares (Gráfico 3). Com base nessas fases pode-se estudar o padrão de crescimento a partir de uma determinada cultura de calos ou suspensão celular.

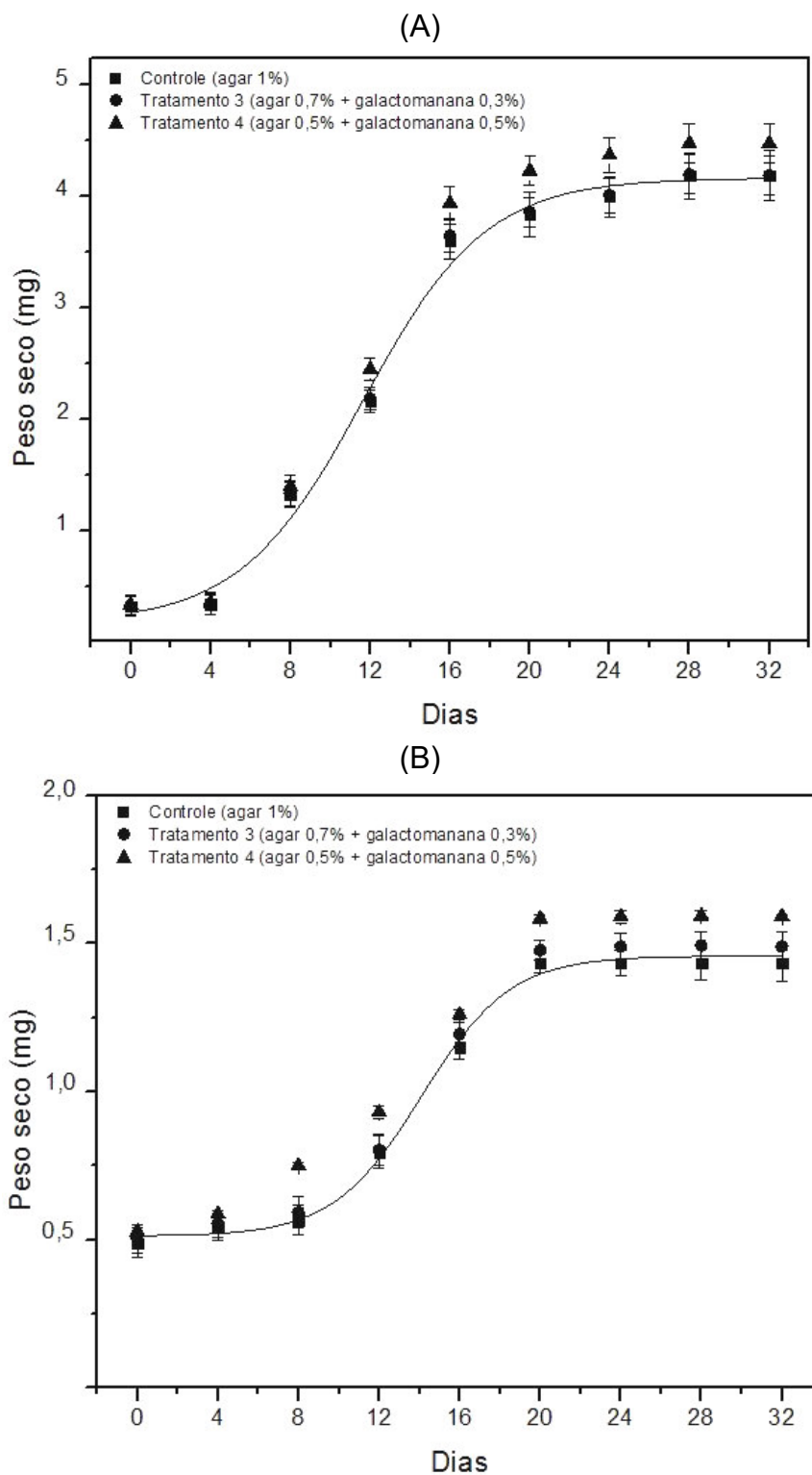
De acordo com os resultados apresentados no Gráfico 4, tanto os calos de origem cotiledonar quanto os originados de hipocótilos, cultivados no meio MS solidificado com as blendas dos tratamentos 3 (Gráfico 4A) e 4 (Gráfico 4B), apresentaram uma curva de crescimento com padrão sigmoidal similar ao controle e de acordo com o diagrama proposto por Dodds e Roberts (1995).

Gráfico 3 – Diagrama das fases de crescimento de uma cultura de células em calos ou em suspensão celular (DODDS, ROBERTS, 1995).



A fase lag, é o período em que as células se preparam para a divisão celular. O período de máxima divisão celular ocorre na fase exponencial (PASQUAL *et al.* 1997). Nesta fase pode-se observar um rápido crescimento dos calos, devido à intensa divisão celular característica deste período. A fase linear ou período de crescimento é aquela na qual as células crescem, no entanto, a divisão celular diminui, conforme cita Krikorian (1995). A fase de desaceleração do crescimento é o período em que se deve fazer a transferência do cultivo para um novo meio nutritivo, devido à exaustão de nutrientes no meio, presença de produtos tóxicos, desidratação do agente gelificante e redução de O<sub>2</sub> no interior das células (SMITH, 1992). Essa fase estacionária é o período no qual o número de células se mantém constante, e geralmente, ocorre o maior acúmulo de proteínas e metabólitos secundários. Sendo assim, torna-se importante obter informações sobre a existência de algum componente limitante (reguladores ou nutrientes), pois, através dele, pode-se ter um controle sobre a longevidade da fase estacionária.

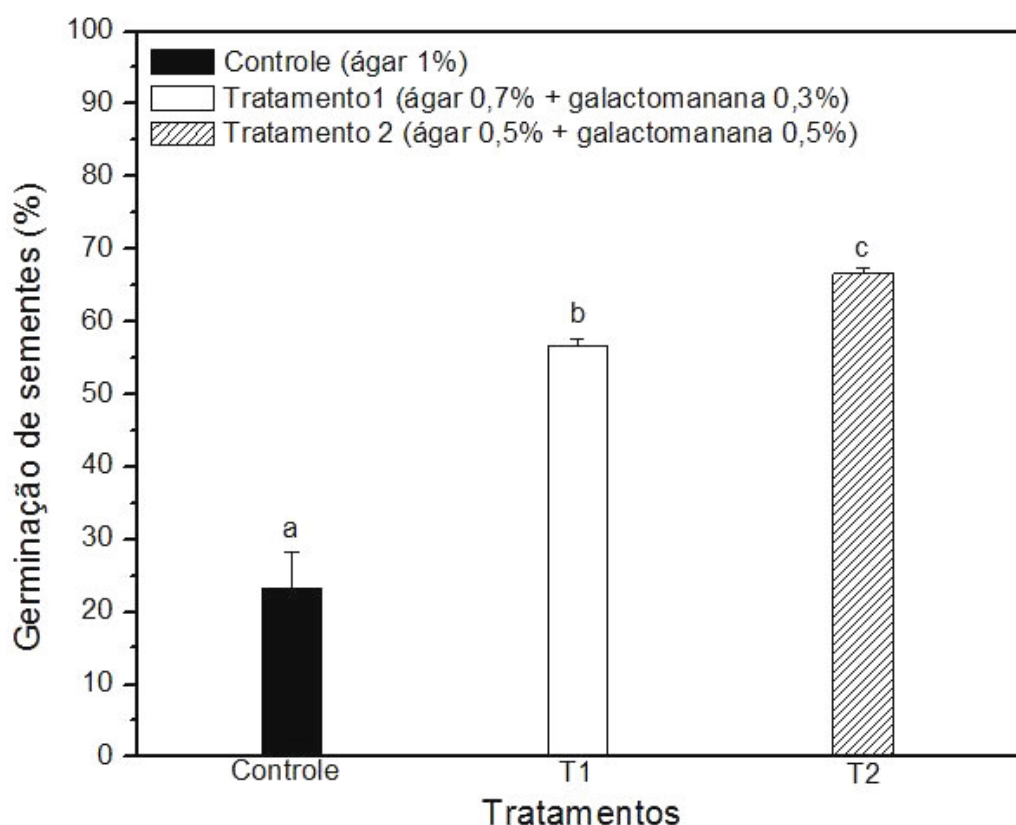
Gráfico 4 – Curvas de crescimento baseado nos valores de peso seco dos calos cotiledonares (A) e de hipocótilos (B) de *G. wightii* cultivados em meio MS gelificados com as blendas dos tratamentos 3 e 4. Cada valor representa a média e o desvio padrão de três repetições.



Os percentuais de germinação de sementes de *G. wightii* nos meios contendo as blendas dos tratamentos 1 e 2, foram significativamente superiores ao do controle (Gráfico 5). Esses resultados indicam que a presença de galactomananas nos meios também podem influenciar, de maneira positiva, o processo germinativo. Durante esse processo, enzimas exudadas pelas próprias sementes podem atuar na quebra das moléculas de galactomananas presentes no meio. A quebra hidrolítica completa de uma molécula de galactomanana e a mobilização desse polissacarídeo após a germinação das sementes envolve a ação de, no mínimo, três enzimas ( $\alpha$ -galactosidase, endo- $\beta$ -mananase e exo- $\beta$ -manosidase). A  $\alpha$ -galactosidase é a primeira enzima a atuar a galactomanana, hidrolisando as ligações  $\alpha$ -1,6 das galactoses ramificadas na cadeia principal de manano (ligados  $\beta$ -1,6), permitindo a ação da endo- $\beta$ -mananase que hidrolisará o polissacarídeo a oligossacarídeos, onde a  $\beta$ -manosidase atuará (ligações  $\beta$ -1,4), transformando esses oligossacarídeos em monossacarídeos que serão utilizados no desenvolvimento do embrião (BUCKERIDGE *et al.*, 2000; LISBOA *et al.*, 2006). Essas enzimas agem em conjunto sobre o polissacarídeo para liberar os monossacarídeos constituintes que são internalizados pelas células vegetais, favorecendo a germinação e o desenvolvimento da plântula. Desta forma, as galactomananas podem atuar como fonte de energia para os processos metabólicos celulares, ação que pode ser justificada pela função de reserva destes polissacarídeos (TINÉ *et al.* 2000).

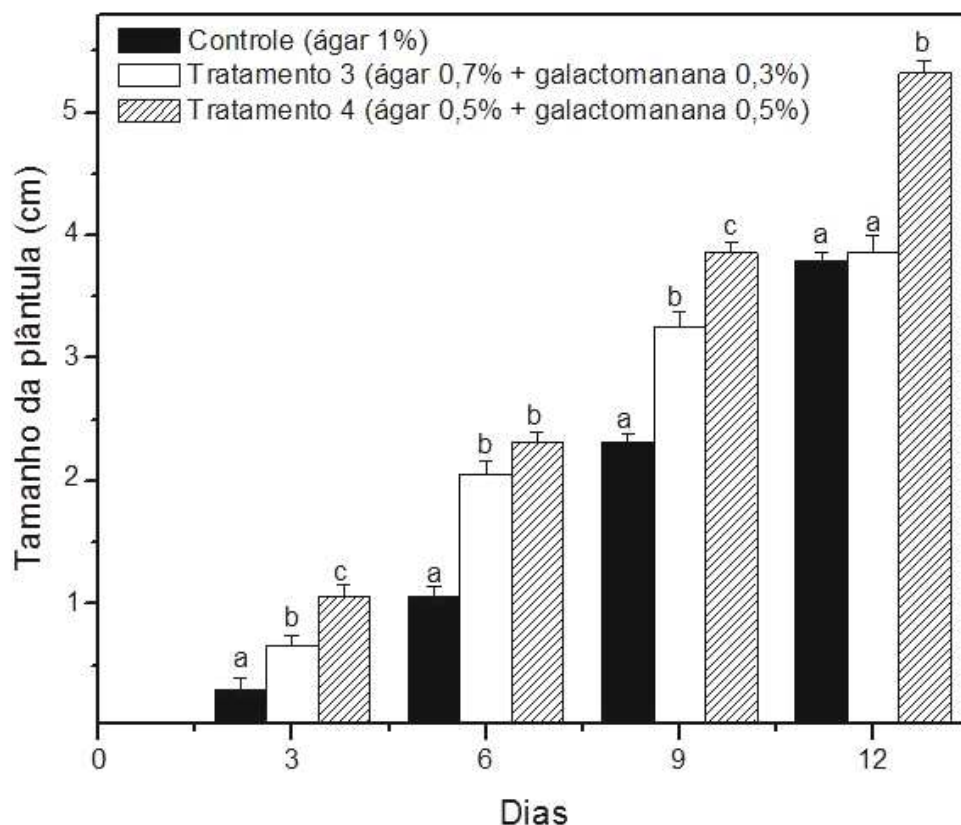
Gráfico 5 – Germinação *in vitro* de sementes de *G. wightii* em meios gelificados com ágar 1% (controle) e com as blendas dos tratamentos 3 (ágar 0,7% + galactomanana 0,3%) e 4 (ágar 0,5% + galactomanana 0,5%). As contagens foram realizadas nos intervalos de 3, 6, 9 e 12 dias. Cada barra representa a média e o desvio padrão de 10 repetições. As médias de cada intervalo, seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).





Os resultados do Gráfico 6 mostram que as blendas dos tratamentos 3 e 4 influenciaram positivamente no desenvolvimento *in vitro* das plântulas de *G. wightii*, apresentando um crescimento mais acelerado que o controle. É importante ressaltar que, além do crescimento mais acelerado, as planturas apresentaram um maior tamanho em relação às plântulas cultivadas no meio controle (Figura 13). Mais uma vez, isso pode estar relacionado à possível utilização das galactomananas pelas plântulas como fonte de energia. Resultados semelhantes foram obtidos por Jain e Babbar (2002) que, utilizando a goma katira como agente gelificante alternativo no meio de cultura de *Syzygium cuminii*.

Gráfico 6 – Avaliação do crescimento das plântulas de *G. wightii* em meios gelificados com ágar 1% (controle) e com as blendas dos tratamentos 3 (ágar 0,7% + galactomanana 0,3%) e 4 (ágar 0,5% + galactomanana 0,5%). As medidas foram realizadas nos intervalos de 3, 6, 9 e 12 dias após a germinação *in vitro*. Cada ponto representa a média e o desvio padrão de 3 repetições



Para avaliar a viabilidade econômica do uso da galactomanana de *A. pavonina* como substituta parcial do ágar nos meios de cultura de tecidos de plantas, foi elaborado uma tabela comparativa (Tabela 4) com vários agentes gelificantes utilizados para a mesma finalidade. Fica evidente que a galactomanana posiciona-se entre os agentes de menor custo, permitindo uma redução de até 50% do valor do ágar, quando utilizada na forma de blends.

Figura 13 – Plântulas de *G. wightii* crescidas *in vitro* por 12 dias. 1) Plântula crescida no meio controle (ágar 1%); 2) Plântula crescida no meio gelificado com a blenda do tratamento 3 (ágar 0,7% + galactomanana 0,3%) e 3) Plântula crescida no meio gelificado com a blenda do tratamento 4 (ágar 0,5% + galactomanana 0,5%).



Tabela 4 – Comparação entre o custo dos diferentes agentes gelificantes utilizados nos meios de cultura de tecidos vegetais.

Agente gelificante	Custo médio <sup>1</sup> (US\$)/ 500 g	Concentração usada (%)
Agarose	700	0-9
Agar	400	0-9
Alginato	90	0-2
Carragenana	110	1
Ficoll	760	10-40
Galactomanana de <i>A. pavonina</i>	20	3
Goma de Guar	90	3
Phytigel	360	0,3-0,5

<sup>1</sup>Custo consultado em catálogos de empresas fornecedoras desses insumos

## 6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que as blendas T1 com as blendas dos tratamentos 3 (ágar 0,7% + galactomanana 0,3%) e 4 (ágar 0,5% + galactomanana 0,5%) podem ser satisfatoriamente utilizadas como agentes gelificantes dos meios de cultivo *in vitro* de tecidos vegetais. Além de apresentarem propriedades físicas similares ou superiores as do ágar, essas blendas também influenciaram de forma positiva no desenvolvimento dos calos, na germinação *in vitro* das sementes e no crescimento das plântulas de soja-perene (*Glycine wightii*).

Do ponto de vista econômico, por ser facilmente extraída de uma planta amplamente distribuída no país e por apresentar um excelente rendimento (~ 90 %), a galactomanana de sementes de *A. paponina* ser um componente promissor na substituição parcial do ágar usado nos meios de cultura de tecidos, proporcionando uma economia de até 50% por quilo de ágar utilizado.

## REFERÊNCIAS

ACKERS, G.K.; STEERE, R. L. Restricted diffusion of macromolecules through agar-gel membranes. **Biochim Biophys Acta**. N. 7; v. 59, p.137-49. 1962

ADRIAN, J.; ASSOUMANI, M. Gums and hydrocolloids in nutrition. p. 301-333. In Rechcigl M. (ed.). **CRC Handbook of Nutritional Supplements**, v. II. Agricultural Use. CRC Press Inc, 1983.

AGHION-PRAT, D. Floral meristem-organizing gradient in tobacco stems. **Nature**, v.207, p. 1211, 1965.

ANDERS, J.; LARRABEE, P. L.; FAHEY, J. W. Evaluation of gelrite and numerous agar sources for *in vitro* regeneration of sugarcane. **HortScience**, v. 23, p. 755, 1988.

BAIARD, J. K. **Industrial gums, polysaccharides and their derivatives**. 3. ed. San Diego: Academic Press, p. 605-618, 1993.

BAILEY, L. H. **Manual of cultivated plants**. 2 ed. New York: Macmillan Publishing, p. 588-589, 1954.

BAJAJ, Y.P.S. Biotechnology in agriculture and forestry, v. 19: High-tech and Micropropagation Plant III. **Springer-Verlag**, 1992a.

BAJAJ, Y.P.S. Biotechnology in agriculture and forestry, v. 20: High-tech and Micropropagation Plant IV. **Springer-Verlag**, 1992b.

BAJAJ, Y.P.S. Biotechnology in agriculture and forestry, v. 7: Medicinal and Aromatic Plant II. **Springer-Verlag**, 1989.

BAJAJ, Y.P.S. Biotechnology in agriculture and forestry, v.21: Medicinal and Aromatic Plants IV. **Springer-Verlag**, 1993.

BAKER, G. L.; CARROW, J. W.; WOODMANSEE, C.W. Three element colloids make better low-solids gels. **Food Industry**, v. 21, p. 617-619, 1949.

BALL, E. Development in sterile culture of stems tips and subjacent regions of *Tropaeolum malus L.* and of *Lupinus albus L.* **Am. J. Bot.**, v. 33, p. 301–318, 1946.

BANIK, R. M.; KANARI, B.; UPADHYAY, S. N. Exopolysaccharide of the gellan family: prospects and potential. **World J. Microb. Biot.**, v. 16, p. 407-414, 2000.

BRESOLIN, T. M. B.; SANDER, P.C.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R.; RINAUDO, M.; GANTER, J. L. M. S. Viscosimetric studies on xanthan and galactomannan systems. **Carbohydr. Polym.**, v. 33, p. 131-138, 1997.

BRESOLIN, T. M. B.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; REICHER, F.; GANTER, J. L. M. S. Role of galactomannan composition on the binary gel formation with xanthan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, p. 225-231, 2006

BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. An Introduction to Rheology. Amsterdam: **Elsevier Science**, p. 199, 1989.

BERGMANN, L. Wachstum grüner Suspensionskulturen von *Nicotiana tabacum* Var. 'Samsun' mit CO<sub>2</sub> als Kohlenstoffquelle. **Planta**, v. 74, p. 243-249, 1967.

BERRIOS, E.F.; GENTZBITTEL, L.; SERIEYS, H.; ALIBERT, G.; SARRAFI, A. Influence of genotype and gelling agents on *in vitro* regeneration by organogenesis in sunflower. **Plant. Cell. Tiss. Cult.**, v. 56, p. 65-69, 1999

BERUTO, D.; BERUTO, M.; CICCARELLI, C.; DEBERGH, P. Matric potential evaluations and measurements for gelled substrates. **Physiol. Plant.**, v. 94, p. 151-157, 1995.

BINSFELD, P. C. Análise diagnóstica de um produto transgênico. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 12, p. 16-19, 2000.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 3 ed. comemorativa do II Congresso Brasileiro de Florestas Tropicais. Mossoró, 1976.

BRIDGEN, M. P. A Review of Plant Embryo Culture. **Hort Science**, v.29, n.11, p.1243-1246, 1994.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. Molilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant. Physiol. Biochem.**, v. 38, n. ½, p. 141-156, 2000.

CAIRNS, P.; MILES, M. J.; BROWNSEY, G. J. X-ray fibre diffraction studies of synergistic, binary polysaccharides gels. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 160, p. 411-423, 1987.

CALLEBERG, E. K.; JOHANSSON, L. B. The effect of starch and incubation temperature in anther culture of potato. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 32, p. 27-34, 1993.

CARLSON, P. S., SMITH, H. H., DEARING, R. D. Parase-xual interspecific plant hybridization. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 69, p. 2292–2294, 1972.

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais. **Embrapa Algodão. Documentos: n. 116**, 2003.

CHANDLER, M. T.; TANDEAU DE MARSAC, N.; KOUCHKOVSKY, Y. Photosynthetic growth of tobacco cells in liquid suspensions. **Can. J. Bot.**, v. 50, p. 2265-2270, 1972.

CHUDZIKOWSKI, R. J. Guar gum and its applications. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, Oxford, v. 22, p. 43-60, 1971.

COCKING, E. C. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. **Nature**, v. 187, p. 962–963, 1960.

COUTO, J. M. F.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L.; FONSECA, E. P. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n.5, p. 633-642, 2004.

DAKIA, P. A.; BLECKR, C.; ROBERT, C.; WATHELET, B; PAQUOT, M. Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment. **Food Hydrocolloids**, v. 22, Issue 5, p. 807–818, 2008.

DAS, N., TRIPATHI, N.; BASU, S.; BOSE, C.; MAITRA, S.; KHURANA, S. Progress in the development of gelling agents for improved culturability of microorganisms. **Front Microbiol.**, v. 6, p. 698, 2015.

DAY, D. Thiamin content of agar. **B. Torrey Bot. Club**, v. 69, p. 11-20, 1942.

DEA, I. C. M. The role of the structural modification in controlling polysaccharide functionality. In: YALPANI, M. (Ed.). **Industrial Polysaccharides: genetic engineering, structure, property relations and applications**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 207-216, 1987.

DEA, I. C. M.; BLANSHARD, J. M. V.; MITCHEL, J. R. In: **Polysaccharides in food**. London: Butterworths, p. 229-247, 1979.

DEA, I. C. M.; CLARK, A. H. Effect of galactose-substitution-patterns on the interaction properties of galactomannans. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 147, p. 275-297, 1986.

DEA, I. C. M.; McKINNON, A. A.; REES, D. A. **Journal of Molecular Biology**, v. 68, p. 153-172, 1972.



DEA, I. C. M.; MORRISON, A. Chemistry and interactions on seed galactomannans. **Advances in Carbohydrate Chemistry Biochemistry**, San Diego, v. 31, p. 241-312, 1975.

DEBERGH, P.C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. **Physiol. Plant.**, v. 59, p. 270-276, 1983.

DEUEL, H.; NEUKON, H. Some properties of locust bean gum. **Advances in Chemistry Series, Oxford**, v. 11, p. 51-61, 1954.

DEY, P. M. Biochemistry of plant galactomannans. **Advances in Carbohydrate Chemistry Biochemistry**, San Diego, v. 35, p. 341-376, 1978.

DODDS, J. H., ROBERTS, L. W. **Experiments in plant tissue culture**. 3. ed. Cambridge, Cambridge University Press, p. 256, 1995.

DUCKOWORTH, M.; YAPHE, W. The structure of agar. Part I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 16, p. 189-197, 1971a.

DUCKOWORTH, M.; YAPHE, W. The structure of agar. Part II. The use of a bacterial agarose to elucidate structural features of the charged polysaccharides in agar. **Carbohydrate Research**, v. 16, p. 435-445, 1971b.

DZIEZAK, J. D. A focus on gums. **Food Technology**, Chicago, v. 45, n. 3, p. 116-132, 1991.

EDWARDS, M.; BULPIN, P. V.; DEA, I. C. M.; REID, J. S. G. Biosynthesis of legume-seed galactomannans *in vitro*. Cooperative interactions of a guanosine 5'-diphosphate-mannose linked (1→4)- beta-D-galactosyltransferase and in particulate enzyme preparations from developing endosperms of fenugreek

(*Trigonella foenum-graecum* L.) and guar (*Cyamopsis tetragonoloba* [L.] Taub.). **Planta**, Berlin, v. 178, p. 41-51, 1989.

EFFEGEM, C.; GONTIJO, A. B. P. L.; CAMPANHARO, A.; GONTIJO, I. Desinfestação e germinação in vitro de sementes de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.). **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18, p.1221-1228, 2014.

EPSTEIN, E. Mineral Nutrition of Plants. Principles and Perspectives. **John Wiley and Sons Inc.**, 1971.

FERNANDES, P. B.; GONÇALVES, M. P.; DOUBLIER, J. L. A rheological characterization of kappa-carrageenan/galactomannan mixed gels: A comparison of locust bean gum samples. **Carbohydrate Polymers**, v. 16, p. 253–274, 1991.

FERRI, M. G. Fisiologia vegetal 1. 2ª ed., São Paulo: **EPU**, 1986.

FIGUEIREDO, L. H. M.; TAKITA, M. A. Cultura de tecidos e transformação genética de citros. **Laranja**, v.25, n.2, p.439-459, 2004.

FRANCK, T.; KEVERS, C.; DEBY-DUPONT, G. Hyperhydricity: a special defense strategy against *in vitro* culture stress conditions? *Archives of Physiology and Biochemistry*, Lisse, v. 106, n. 1, p. 71, 1998.

FRIML, J.; VIETEN, A.; SAUER, M.; WEIJERS, D.; SCHWARZ, H.; HAMANN, T.; OFFRINGA, R.; JÜRGENS, G. Efflux dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. **Nature**, v. 426, p. 147-153, 2003.

FUKAMI, T.; HILDEBRANDT, A. C. Growth and chlorophyll formation in edible green plant callus tissues *in vitro* on media with limited sugar supplements. **Bot. Mag.**, v. 80, p. 199-212, 1967.

GANESAN, M.; REDDY, C. R. K.; JHA, B. Impact of cultivation on growth rate and agar content of *Gelidiella acerosa* (Gelidiales, Rhodophyta). **Algal Research**, v. 12, p. 398-404, 2015.

GANTER, J. L. M. S.; REICHER, F. Water-soluble galactomannans from seeds of *Mimosaceae* spp. **Bioresource Technology**, v. 68, p. 55-62, 1999.

GANTER, J. L. M. S.; ZAWADZKI-BAGGIO, S. F.; LEITNER, S. C. S.; SIERAKOWSKI, M.-R.; REICHER, F. J. Structural studies on galactomannan from Brazilian seeds. **Carbohydrate Chemistry**, v. 12, p. 753-767, 1993.

GAUTHERET, R. . Sur la possibilite´ de re´ aliser la culture inde´ finie des tissus de tubercules de carotte. **C. R. Soc. Biol.**, v. 208, p. 118–120, 1939.

GEORGE, E. E.; HALL, M. A.; KLERK, G. D. Plant propagation by tissue culture, v. 1, The Background. 3<sup>a</sup> ed. **Springer**, p.508, 2008.

GLICKSMAN, M. Gelling hydrocolloids in food product applications In: BLANSHARD, J. M. V.; MITCHEL, J. R. (Ed.). **Polysaccharides in Food**. Butterworths: London, p.185-204, 1979.

GLICKSMAN, M. Origins and classification of hydrocolloids. Food Hydrocolloids. **Oxford**, v. 1, p. 3, 1982.

GLICKSMAN, M. Tara gums. In: GLICKSMAN, M. (Ed.). **Food Hydrocolloids 3**. Boca Raton: CRC Press, p. 185-189, 1986.

GOLDSTEIN, A. M.; ALTER, E. N.; SEAMAN, J. K. Guar gum. In: WHISTLER R. L.; BEMILLER, J. N. (Ed.). **Industrial gums**. London: **Academic Press**, p. 303-321, 1973.

GONÇALVES S.; ROMANO, A. *In vitro* minimum growth conservation of *Drosophyllum lusitanicum*. **Biologia Plantarum**, v.51, p.795-798, 2007.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, p. 99-169, 1990.

GUHA, S.; MAHESHWARI, S. C. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. **Nature**, v. 212, p. 97–98, 1966.

GYVES, E. M. Agrobiotecnologia. **México: Iberoamérica**, p.78, 1994.

HABERLANDT, G. Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. **Sitz-Ber. Mat. Nat. Kl. Kais. Akad. Wiss.**, p.111 69–11192, 1902.

HANNING, E. Zur Physiologie pflanzenlicher Embryonem, I Uberdie Kultur von Cruciferen-Embryonen ausser-halb des Embryosacks. **Z Bot**, v. 62, p. 45-80, 1904.

HENDERSON, W. E.; KINNERSLEY, A. M. Corn starch as an alternative gelling agent for plant tissue culture. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 15, p. 17-22, 1988.

HERALD, C. J. Guar Gum. In: GLICKSMAN, M. (Ed.). **Food Hydrocolloids 3**. Boca Raton: CRC Press, p. 172-183,1986a.

HERALD, C. J. Locust/Carob bean gum. In: GLICKSMAN, M. (Ed.). **Food Hydrocolloids 3**. Boca Raton: CRC Press, p. 161-170, 1986b.

HORSCH, R. B.; FRY, J. E.; HOFFMANN, N.; EICHOLZ, D.; ROGERS, S. G.; FRALEY, R. T. A simple and general method for transferring genes into plants. **Science**, v. 227, p. 1229-1231, 1985.

HUSSAIN, A.; QARSHI, I. A.; NAZIR. H.; ULLAH, I. **Recent Advances in Plant *in vitro* Culture** . Cap 1: Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities , p. 1-28, 2012.

HYMOWITZ, T. On the domestication of the soybean. **Econ. Bot.**, v. 24, Issue 4, p. 408-421, 1970.

ICHI, T.; KODA, T.; ASAI, I.; HATANAKA, A.; SEKIYA, J. Effects of gelling agents on *in vitro* culture of plant tissues. **Agric. Biol. Chem.**, v. 50, p. 2397-2399, 1986.

ITOH, K.; YAHABA, M.; TAKAHASHI, A.; TSURUYA, R.; MIYAZAKI, S.; DAIRAKU, M.; TOGASHI, M.; MIKAMI, R. Attwood In situ gelling xyloglucan/pectin formulations for oral sustained drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 356, p. 95–101, 2008.

IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Influence of gelling agents and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)** – Springer, v. 104, p. 13-21, 2011.

JAIN, N.; BABBAR, S. B. Xanthan gum: an economical substitute for agar in plant tissue culture media. **Plant Cell Reports** 25: 81-84. 2006.

JI, S.; CORREDIG, M.; GOFF, H.D. Aggregation of casein micelles and  $\kappa$ -carrageenan in reconstituted skim milk. *Food Hydrocolloids*, v.22, p.56-64, 2008.

KANG, K. S.; VEEDER, G. T.; MIRRASOUL, P. J.; KANEKO, T.; COTTRELL, W. Agar-like polysaccharide produced by a *Pseudomonas* species: Production and basic properties. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 43, p. 1086-1091, 1982.

KANTA, K.; RANGASWAMY, N. S.; MAHESHWARI, P. Testtube fertilization in a flowering plant. **Nature**, v. 194, p. 1214–1217, 1962.

KEVERS, C.; FRANCK, T.; STRASSER, R. J.; DOMMES, J. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)** – Springer, v.77, p. 181-191, 2004.

KHOURYIEH, H. A.; HERALD, T. J.; ARAMOUNI, F.; ALAV I, S. Intrinsic viscosity and viscoelastic properties of xanthan/guar mixtures in dilute solutions: Effect of salt concentration on the polymer interactions. *Food Research International*, v. 40, p. 883–893, 2007.

KOETJE, D. S.; GRIMES, H. D.; WANG, Y. C.; HODGES, T.K. Regeneration of indica rice (*Oryza sativa* L.) from primary callus from immature embryos. *J. Plant Physiol.*, v. 13, p. 184-190, v. 1989.

KOGH, F.; HAAGEN\_SMIT, A. J; ERXLEBEN, H. Uber ein neus auxin ('Hetero-auxin') aus harn. **Zeitschrift fuer Physiologische Chemie**, v. 228, p. 90-103, 1934.

KOTTE, W. Kulturversuch isolierten Wurzelespitzen. **Beitr. Allg. Bot.**, v. 2, p.413–434, 1922.

KRENS, F. A.; MOLENDIJK, L.; WULLEMS, G. J.; SCHILPEROORT, R. A. *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. **Nature**, v. 296, p. 72-74, 1982.

KRIKORIAN, A. D. Hormones in tissue culture and micropropagation. **In: Davies, P.J. Plant hormones. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers**, p. 774-796, 1995.

LAIBACH, F. Das Taubwerden von Bastardsamen und die Kunstliche aufzucht von fruh absterbenden Bastardembryonen. **Z. Bot.**, v. 17, p. 417-459, 1925.

LAPASIN, R.; PRICL S. **Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications**. London: Blackie Academic & Professional, p. 620 1995.

LARKIN, P. J.; DAVIES, P. A.; TANNER, G. J.. Nurse cultures of low numbers of *Medicago* and *Nicotiana* protoplasts using calcium alginate beads. **Plant Sci.**, v. 58, p. 203-210, 1988.

LAROSA, P. C., HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. Initiation of photoautotrophic potato cells. **HortScience**, v. 16, p. 433, 1981.

LEITNER, S. C. S. **Estudo de polissacarídeos da semente de *Stryphnodendron barbatiman* (Barbatimão)**. Curitiba, 1991. 122 f. Tese (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 1991.

LIMA-NISHIMURA, N.; QUOIRIN, M.; NADDAF, Y. G.; WIHELM, H.M.; RIBAS, L. L. F.; SIERAKOWSKI, M. R. A xyloglucan from seeds of the native brazilian species *Hymenaea courbaril* for micropropagation of Marubakaido and Jonagored apples. **Plant Cell. Rep.**, v. 21, p. 402-407, 2003.

LINSMAIER, E. M.; SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, v. 18, p. 100- 127, 1965.

LISBOA, C. G. S.; TONINI, P. P.; TINÉ, M. A. S.; BUCKERIDGE, M. S. Endo-beta-mannanase from the endosperm of seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.(Leguminosae): purification, characterisation and its dual role in germination and early seedling growth. *Brazilian Journal. Plant Physiology*. v. 18, n. 2, p. 269-280, 2006.

LOYOLA-VARGAS, V. M.; VAZQUEZ-FLOTA, E. Plant cell cultures protocols. 2<sup>a</sup> ed. **Humana Press Inc.**, 2006.

LUCYSZYN, N. **Aplicação de galactomananas como substitutas parciais do ágar no cultivo de tecidos vegetais**, Curitiba, 2004. 126 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológico) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2004.

LUCYSZYN, N. **Galactomananas: novas fontes do biopolímero e aplicações na indústria alimentícia**, Curitiba, 1994. 190 f. Dissertação (Mestrado em

Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 1994.

LUCYSZYN, N. **Galactomananas: novas fontes do biopolímero e aplicações na indústria alimentícia**. 1994. 150f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1994..

LUCYSZYN, N.; QUOIRIN, M.; KOEHLER, H. S.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R. Ágar/galactomannan blends for strawberry (*Fragaria X ananassa* Duchesne) cv. Pelican micropropagation. **Scientia Horticulturae**, v. 107, p 358-364, 2006.

LUCYSZYN, N.; QUOIRIN, M.; HOMMA, M. M.; SIERAKOWSKI, M. R. Agar/galactomannan gels applied to shoot regeneration from tobacco leaves. **Biologia Platarum**, v. 51, n. 1, 173-176, 2007.

LUCYSZYN, N.; SUGUI, J. A.; REICHER, F.; GANTER, J. L. M. S. Aplication of the galactomannan from *Mimosa scabrella* (bracatinga) as starch substitute in food formulations. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NATURAL POLYMERS AND COMPOSITES – ISNAPOL/2000, 3; WORKSHOP ON PROGRESS IN PRODUCTION AND PROCESSING OF CELLULOSIC FIBRES AND NATURAL POLYMERS, 2000, São Pedro, SP, Brazil. **Natural Polymers and composites: proceedings**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária/USP-IQSC/Botucatu: UNESP, p. 233-237, 2000

MAHESHWARI, P.; RANGANSWAMY, N. S. Polyembryony and in vitro culture of embryos of *Citrus* and *Mangifera*. **Indian Journal of Horticulture**, v. 15, p. 275-282, 1958.

MAIER, H.; ANDERSON, M.; KARL, C.; MAQNUSON, K.; WHISTLER, R. L. Guar, locust bean, tara and fenugreek gums. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N. (Ed.). **Industrial Gums: Polysaccharides And Their Derivatives**. 3. ed. New York: Academic Press, p. 215-218, 1993.



McCLEARY, B. V.; AMADO, R.; WAIBEL, R.; NEUKON, H. Effect of galactose content on the solution and interaction properties of guar and carob galactomannans. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 92, p. 269-285, 1981.

MEENA, R.; PRASAD, K.; SIDDHANTA, A.K. Development of a stable hydrogel network based on agar–kappa-carrageenan blend cross-linked with genipin. *Food Hydrocolloids*, v. 23, p. 497–509, 2009.

MELCHERS, G.; BERGMANN, L. Untersuchungen an Kulturen von haploiden Geweben von *Antirrhinum majus*. **Ber. Dtsch.Bot. Ges.**, v. 78, p. 21-29, 1959.

MELCHERS, G.; SACRISTAN, M. D.; HOLDER, A. A. Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. **Carlsberg Res. Commun**, v. 43, p. 203–218, 1978.

MILLER, C. O.; SKOOG, F.; SALTZA, M.; STRONG, F. M. Kinetin, a cell division factor from desoxyribonucleic acid. **Journal American Chemical Society**, v. 77, p.1392, 1955.

MONTEIRO, A. J. L. C. A biotecnologia no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 14, nº 3, p. 26-27, 2000.

MOREL G. Producing virus-free *Cymbidiums*. **American Orchid Society**, v. 29, p. 495–497, 1960.

MOREL, G., MARTIN, C. Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 235, p. 1324–1325, 1952.

MORRIS, E. R. Mixed polymer gels. In: HARRIS, P. Food Gels. London: **Elsevier Applied Science**, p. 291-359, 1990.

MORRIS, V. J.; MILES, M. J. Effect of natural modifications on the functional properties of extracellular bacterial polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, Alexandria, v. 8, p. 342-348, 1986.

MUIR, W. H.; HILDERBRANDT, A. C.; RIKER, A. J. Plant tissue cultures produced from single isolated cells. **Science**, v. 119, p. 877-878, 1954.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, v.25, p. 135-166, 1974.

MURASHIGE, T.; BITTERS, W. P.; RANGAN, T. S.; NAUER, E. M.; ROISTACHER, C. N.; HOLLIDAY, P. B. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free *Citrus* clones. **HortScience**, v. 7, p. 118-119, 1972.

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

NAIRN, B. J. Significance of gelling agents in a production tissue culture laboratory. **Comb. Roc. Int. Plant Prop. Soc.**, v. 37, p. 200-205, 1988.

NEUKON, H. Galactomannans: properties and applications. **Lebensmittel-Wissenschaft und- Technologie**, Zürich, v. 22, p. 41-45, 1989.

NEVES, J. M. G.; SILVA, H. P., BRANDÃO JUNIOR, D. S.; MARTINS, E. R.; NUNES, U. R. Padronização do teste de germinação para sementes de Pinhão Manso. **Revista Caatinga**, v.22, p. 76-80, 2009.

NOBECOURT, P. Sur les radicules naissant des cultures de tissue du tubercule de carotte. **C R seances Soc Biol Ses Fil**, v. 130, p. 1271-1272, 1939.

NORZIAH, M. H.; FOO, S. L.; KARIM, A. ABD. Rheological studies on mixture of agar (*Gracilaria changii*) and k-carrageenan. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 204-217, 2006.

PALMA, D.; SCHUELTER, A.R; STEFANELLO, S.; FORTES, A.M.T. Aspectos morfofisiológicos e controle da hiperhidricidade na cultura de tecidos vegetais. Bras. Agrociência, v.17, n.2-4, p.174-184, 2011.

PASQUAL, M.; CARVALHO, G.R.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. Cultura de tecidos: Tecnologia e aplicações: Aplicações no melhoramento genético de plantas. **Lavras**: [s.n.], 1997.

PASQUALETTO, P. L.; ZIMMERMAN, R. H.; FORDHAM, I. The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars *in vitro*. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 14, p, 31-40, 1988.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações – introdução: fundamentos básicos**. Lavras, UFLA/FAEPE, p. 159, 1997.

PETKOWICZ, C. L. O. **Biopolímeros da semente de *Schizolobium amazonicum* (Pinho cuiabano): galactomananas e arabinanas**. Curitiba, 1993. 106 f. Tese (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 1993.

PETKOWICZ, C. L. O.; GANTER, J. L. M. S.; SIERAKOWSKI, M.-R.; REICHER, F. Galactomannans and arabinans from seeds of *Caesalpinaceae*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 737-743, 1998.

PETKOWICZ, C. L. O.; REICHER, F.; CHANZY, H.; TARAVEL, F. R.; VUONG, R. Linear mannan in the endosperm of *Schizolobium amazonicum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, p. 107-112, 2001.

PIERIK, R.L.M. Cultivo *In vitro* de las plantas superiores. Madrid: **Mundiprensa**, 1988.

PIERIK, R.L.M. *In vitro* culture of higher plants as a tool in the propagation of horticultural crops. **Acta Hortic.**, v. 226, p. 25-40, 1988.

PIRES, L.; GORIN, P. A. J.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M-R. An active heparinoid obtained by sulphatation of a galactomannan extracted from the endosperm of *Senna macranthera* seeds. **Carbohydrate Polymers**, Shannon, v. 46, n.2, p. 165-169, 2001.

RAVEN, P. H. , EVERT, R. F.; CURTIS, H. Biologia vegetal, 2<sup>a</sup> ed., p. 724, Rio de Janeiro. **Guanabara Dois**, 1978.

REES, D. A. Shapely polysaccharides. **Biochemistry Journal**, Tokyo, v. 126, p. 257-273, 1972.

REICHER, F.; LEITNER, S. C. S.; SIERAKOWSKI, M. R.; FONTANA, J. D.; CORRÊA, J.B. C. Seeds gum of *Stryphnodendron barbatiman* (Barbatimão). **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 28-29, p. 353-361, 1991.

REINERT, J. Untersuchungen über die Morphogenese an Gewebekulturen. **Ber Dtsch Bot Ges**, v. 71, p. 15, 1958.

RING, S.; STAINSBY, G. Filler reinforcement of gels. **Prog. Food Nutr. Sci.**, v. 6, p. 323- 329, 1982.

ROBBINS, W. J. Cultivation of excised root tips and stem tips under sterile conditions. **Bot. Gaz.**, v. 73, p. 376-390, 1922.

SACHS, J. V. Histoire de la botanique – du XV<sup>o</sup> siècle a 1860. Trad. Henry de Varigny. Paris: **C. Reinwald & Cie.**, 1892.

SHAW, D. J. **Introdução à química dos colóides e de superfícies**. São Paulo: Editora Edgard Clucher Ltda, p. 184, 1975.

SCHERER, P. A.; MULLER, E.; LIPPERT, H.; WOLFF, G. Multielement analysis of agar and gelrite impurities investigated by inductively coupled plasma emission spectrometry as well as physical properties of tissue culture media prepared with agar or gellan gum gelrite. **Acta Hortic.**, v. 226, p. 655-658, 1988.

SHCHERBUKHIN, V. D. Galactomannans of native flora (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscou, v. 29, n.6, p. 599-606, 1993.

SCHOLTEN, H.J.; PIERIK, R.L.M. Agar as a gelling agent : Chemical and physical analysis. *Plant Cell Report.*, v. 17, p.230-235, 1998

SHILLITO, R. D.; PASZKOWSKI, J.; POTRYKUS, I. Agarose plating and a bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in a number of plant species. **Plant Cell Rep.**, v. 2, p. 244-247, 1983.

SHOBHA, M. S.; THARANATHAN, R. N. Rheological behavior of pullulanase-treated guar galactomannan on co-gelation white xanthan. **Food Hydrocolloids**, v.23, p. 749-754, 2009

SILBERBERG, A. Gelled aqueous systems. In: GLASS, J. E. **Polymers in aqueous media**. Washington: American Chemical Society, p. 3-14, 1989.

SILVA, A. L. C.; CARUSO, C. S.; MOREIRA, R. A.; HORTA, A. C. G. Indução *in vitro* de calos em explantes de cotilédones e hipocótilos de *Glycine wightii* (Wight & Arn.) Verdc. **Ciênc. Agrotec.**, v. 27, n. 6, p. 1277-1284, 2003.

SKIRVIN, R. M.; KENNETH, D. M.; NORTON, M. Sources and Frequency of Somaclonal Variation. **HortScience**, v.29, nº 11, p.1232-1237, 1994.

SKOOG, F.; TSUI, C. Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured in vitro. **Am. J. Bot.**, v. 35, p. 782, 1948.

SMITH, R.H. **Plant tissue culture: techniques and experiments. San Diego, Academic Press**, p. 71, 1992.

SMITH, S. M.; MURASHIGE, T. *In vitro* development of the isolated shoot apical meristem of angiosperms. **American Journal of Botany**, v. 57, p. 562-568, 1970.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; STEIN, V. C.; NERY, F.C.; NOGUEIRA, R. C. OLIVEIRA, L. M. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA3 e pH sobre a germinação in vitro de mangabeira (*Hancornia speciosa gomes*). **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 1847 -1852, 2009.

SONI, S. K.; BOSE, S. Seed galactomannans and their strutures. **J. Scient. Indust. Res.**, Calcutta, v. 44, p. 544-547, out. 1985.

SORVARI, S. Comparison of anther cultures of barley cultivars in barley-starch and agar gelatinized media. **Ann. Agric. Fenn.**, v. 25, p. 249-254, 1986c.

SORVARI, S. Differentiation of potato discs in barley starch gelatinized nutrient media. **Ann. Agric. Fenn.**, v. 25, p. 135-138, 1986b.

SORVARI, S. The effect of starch gelatinized nutrient media in barley anther cultures. **Ann. Agric. Fenn.**, v. 25, p. 127-133, 1986a.

SORVARI, S.; TOLDI, O.; AHANEN, K.; VIINAMÄKI, T.; HAKONEN, T.; TAHVONEN, R. Using polysaccharides and galactomannans as gelling agents in

capsule formation of artificial seeds. **Journal American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 122, n. 6, p. 878-883, 1997.

SOUSA, P. B. L.; SANTANA, J. R. F.; CREPALDI, I. C.; LIMA, A. R. Germination in vitro of seeds of a threatened arboreal specie in the municipal district of Abaíra (BA). **Sitientibus**, v.20, p.89-99, 1999.

STANLEY, N. F. Agars. In: STEPHEN, A. M. Food polysaccharides and their applications. **Marcel Dekker**, p. 187-204, 1995.

STEWARD, F. C.; CAPLIN, S. M.; MILLER, F. K. . Investigations on growth and metabolism of plant cells. I. New techniques for the investigation of metabolism, nutrition, and growth in undifferentiated cells. **Ann. Bot.** (Lond.), v. 16, p. 57–77, 1952.

STEWARD, F. C.; MAPES, M. O.; MEARS, K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. **Am J Bot**, v. 45, p. 705–708, 1958.

SUSSEX, I. M.; STEEVES, T. A.. Growth of excised fern leaves in sterile conditions. **Nature**, v. 172, p. 624-627, 1953.

TAKAHASHI, E.K. **Transferência do gene atacina A para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Deg.*) por biobalística**. 2002. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

TAKO, M.; NAKAMURA, S. Synergistic interaction between agarose and D-galacto-Dmannan in aqueous media. **J. Agric. Biol. Chem.**, v. 52, p. 1071-1072, 1988.

TANDEAU DE MARSAC, N.; PEAUD-LENOEL, C. Cultures photosynthétique de lignes clonales de cellules de tabac. **Compt. Rend. Acad. Sci. Paris** **274D**, p. 1800-1802, 1972a.

TAVARES, G. A. **Estrutura e propriedades da galactomanana de sementes de *Cassia fastuosa* Willd. (cássia)**. Curitiba, 1994. 80 f. Tese (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 1994.

TAVARES, R. O. **Galactomanana de *Adenanthera pavonina* L. Aplicação para o isolamento de lectinas galactose-específicas**. 1998. 95f. Dissertação (Mestrado em bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.

THORPE, T. A. The current status of plant tissue culture. **Plant Tissue Culture: Applications and Limitations (Bhojwani, S. S., ed.)**, Elsevier, p. 1–33, 1990.

TINÉ, M.A.S.; CORTELAZZO, A.L.; BUCKERIDGE, M.S. Xyloglucan mobilisation in cotyledons of developing plantlets of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae-Caesalpinoideae). *Plant Science*, 154:117-126, 2000.

TOLSTOGUZOV, V. B. e BRAUDO, E. E. Fabricated foodstuffs as multicomponent gels. **Journal Texture studies**, Auckland, v. 14, p. 183-212, 1983.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. 1.ed. Brasília: **Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ**, v.1, p. 509, 1998.

TULECKE, W. A Tissue Derived from the Pollen of *Ginkgo biloba*. **Science**, v. 117, n. 3048, p. 599-600, 1953.

TURQUOIS, T.; DOUBLIER, J-L.; TARAVEL, F-R.; ROCHAS, C. Synergy of the Kcarrageenan-carob galactomannan blend inferred from rheological studies.



**International Journal of Biological Macromolecules**, Shannon, v. 16, n.2, p. 105-107, 1994.

TURQUOIS, T.; TARAVEL, F. R.; ROCHAS, C. Synergy of the agarose-carob-galactomannan blend inferred from NMR and rheological studies. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 238, p. 27-38, 1993.

VAN OVERBEEK, J.; CONKLIN, M. E.; BLAKESLEE, A. F. Factors in coconut milk essential for growth and development of *Datura* embryos. **Science**, v. 94, p. 350, 1941.

VARGAS-RECHIA, C. G.; SIERAKOWSKI, M.-R.; GANTER, J. L. M. S.; REICHER, F. Polysaccharides from the seeds of *Senna multijuga*. **International Journal of Macromolecules**, v. 17, p. 409-413, 1995.

VIEBKE, C.; PICULELL, L. Adsorption of galactomannans onto agarose. **Carbohydrate Polymers**, Shannon, v. 29, n.1, p. 1-5, 1992.

VIETEZ, A. M.; SAN-JOSÉ, M. C. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants *in vitro*. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 32, n. 3, p. 140-147, 1996.

WARD, F. M.; ANDON, S. A. Water-soluble gums used in snack foods and cereal products. **Cereal Foods World**, St. Paul, v. 38, n. 10, p. 748-752, 1993.

WHISTLER, R. L.; SMART, L. C. **Polysaccharide Chemistry**. New York: Academic Press, p. 493, 1953.

WHITE, P. R. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. **Plant Physiol.**, v. 9, p. 585–600, 1934.

WHITE, P.R. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. **Am. J. Bot.**, v. 26, p. 59–64, 1939.

WHITNEY, S. E. C.; BRIGHAM, J. E.; DARKE, A. H.; REID, G. J. S.; GIDLEY, M. J. Structural aspects of the interaction of mannan-based polysaccharides with bacterial cellulose. *Carbohydrate Research*, v. 307, p. 299–309, 1998.

WICKSON, M.; THIMANN, K. V. The Antagonism of Auxin and Kinetin in Apical Dominance. *Physiologia Plantarum*, v. 11, p. 62-74, 1958.

WU, Y.; CUI, W.; ESKIN, N. A. M.; GOFF, H. D. Rheological investigation of synergistic interactions between galactomannans and non-pectic polysaccharide fraction from water soluble yellow mustard mucilage. *Carbohydrate Polymers*, v. 78, Issue 1, p. 112–116, 2009.

ZAENEN, I.; VAN LAREBEKE, N.; TEUCHY, H.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *Journal of Molecular Biology*, v. 86, p. 109-127, 1974.

ZAWADZKI-BAGGIO, S. **Arabinana e galactomanana de *Schizolobium parahybum*. Estudo da biossíntese de galactomanana.** Curitiba, 1994. 149 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 1994.

ZHAN, D. F.; RIDOUT, M. J.; BROWNSEY, G. J.. MORRIS, V. J. Xanthan-locust bean interactions and gelation. *Carbohydrate Polymers*, Shannon, v. 21, p. 53-58, 1993.

ZIMMERMAN, R. H. The laboratory of micropropagation at Cesena, Italy. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, v. 29, p. 398-400, 1979.

ZIMMERMAN, R. H.; BHARDWAJ, S. V.; FORDHAM, I. M. Use of starch-gelled médium for tissue of some fruit crops. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 43, p. 207-213, 1995.

ZIMMERMANN, U.; VIENKEN, J. Electric field-induced cell-to-cell fusion. *J Membr Biol*, v. 67, p. 165-182, 1982.