

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

ELIAS TERRA WERNER

**CULTIVO *IN VITRO* DE *Crambe abyssinica* Hochst.:
GERMINAÇÃO, MICROPROPAGAÇÃO,
ESTABILIDADE GENÉTICA E ANATOMIA FOLIAR**

ALEGRE

2014

ELIAS TERRA WERNER

**CULTIVO *IN VITRO* DE *Crambe abyssinica* Hochst.:
GERMINAÇÃO, MICROPROPAGAÇÃO,
ESTABILIDADE GENÉTICA E ANATOMIA FOLIAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de DOUTOR em PRODUÇÃO VEGETAL na área de concentração Biotecnologia e Ecofisiologia do Desenvolvimento de Plantas.

Orientador: Prof. Dr. José Augusto Teixeira do Amaral.

Coorientadores: Prof.^a Dr.^a Andreia Barcelos Passos Lima; Prof.^a Dr.^a Taís Cristina Bastos Soares; Prof. Dr. Edilson Romais Schmildt

ALEGRE

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

W492c Werner, Elias Terra, 1983-
Cultivo in vitro de *Crambe abyssinica* Hochst.: germinação, micropropagação, estabilidade genética e anatomia foliar / Elias Terra Werner. – 2014.
180 f. : il.

Orientador: José Augusto Teixeira do Amaral.

Coorientador: Andreia Barcelos Passos Lima; Taís Cristina Bastos Soares; Edilson Romais Schmidt.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Biodiesel. 2. Plantas – propagação in vitro. 3. Reguladores de crescimento. 4. *Crambe*. I. Amaral, José Augusto Teixeira do. II. Lima, Andreia Barcelos Passos. III. Soares, Taís Cristina Bastos. IV. Schmidt, Edilson Romais. V. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. VI. Título.

CDU: 63

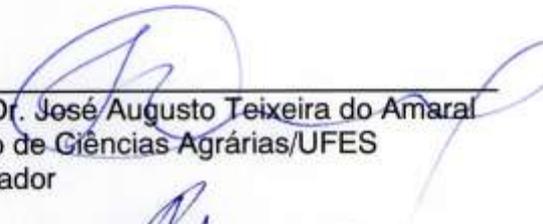
ELIAS TERRA WERNER

**CULTIVO *in vitro* De *Crambe abyssinica* HOCHST.: GERMINAÇÃO,
MICROPROPAGAÇÃO, ESTABILIDADE GENÉTICA E ANATOMIA FOLIAR**

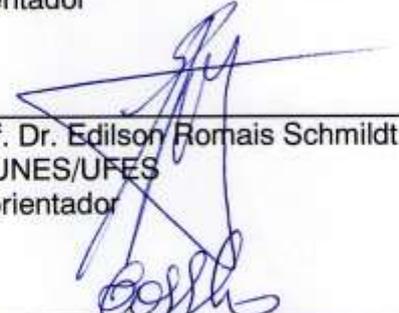
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal, na linha de pesquisa Biotecnologia e Ecofisiologia Vegetal.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2014

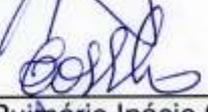
COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof. Dr. José Augusto Teixeira do Amaral
Centro de Ciências Agrárias/UFES
Orientador



Prof. Dr. Edilson Romais Schmildt
CEUNES/UFES
Coorientador



Prof. Dr. Ruimário Inácio Coelho
Centro de Ciências Agrárias/UFES



Prof. Dr. Paulo César Cavatte
Centro de Ciências Agrárias/UFES



Dr. Aymbiré Francisco Almeida da Fonseca
EMBRAPA Café/INCAPER

Dedico à minha esposa Laila e a meus pais, Helmo e Reneida, pelo amor, amizade, apoio, palavras de incentivo e minha educação, minha maior herança. Por contribuírem para meu sucesso e para meu crescimento como pessoa, sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.

Agradecimentos

Ao meu Deus e Pai, por tudo o que vivi, sei que a vitória apenas Dele é que vem.

À minha esposa, Laila, essa grande mulher que com sabedoria me apoiou e soube superar a distância, a saudade e a ausência nas horas de estudo, obrigado por tanto amor, pela boa convivência e por me fazer completo.

Aos meus pais, Helmo e Reneida, pelo incondicional apoio e orações em todas as horas.

Aos meus sogros, Célio e Marines, por serem especiais, sempre preocupados e atenciosos.

À minha Família, em especial meus irmãos Anderson e Letícia, por acreditarem sempre neste ideal, pois sei que tudo na vida pode passar, porém família sempre prevalecerá.

Aos amigos, considerados mais que irmãos, Amilton, Stéfanie, Victor, Paulo Henrique, Filipe, Paulo Rocha, João, Thiago e Wallas, pelo auxílio e sugestões durante toda a realização do trabalho, e que além de morarem comigo estarão sempre presente em meu coração.

A todos os meus amigos, em especial Vitor, Rodrigo e Sindy, pela constante atenção e amizade dedicada, gostaria de registrar toda a minha admiração por vocês.

Aos amigos de laboratório, Renan, Jaqueline e José Dias, que de alguma forma trabalharam e contribuíram para a conclusão dos experimentos.

Ao Prof. Dr. José Augusto Teixeira do Amaral, pela orientação, incentivo, ensinamentos na realização deste trabalho, disponibilidade e paciência.

À Prof.^a Dr.^a Andreia Barcelos Passos Lima, pela amizade e por sempre estar presente nas horas de dúvidas e incertezas científicas.

Aos coorientadores, Prof. Dr.^a Taís Cristina Bastos Soares e Prof. Dr. Edilson Romais Schmidt, pela contribuição inestimável a este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

À primeira turma do DOUTORADO EM PRODUÇÃO VEGETAL de 2010, pelas lutas, diversões, alegrias, tristezas, mas com vitórias. Vocês todos fazem parte desta realidade.

À Universidade Federal do Espírito Santo, pela oportunidade de realizar este trabalho e possibilitar a conclusão desta pós-graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, no que tange seus professores, pelos ensinamentos adquiridos e apoio teórico-prático.

À querida Madalena, secretária da pós-graduação, por solucionar tão prontamente todos os nossos impossíveis problemas de forma rápida e eficaz.

Aos componentes da banca examinadora: Prof. Dr. José Augusto Teixeira do Amaral, Prof. Dr. Edilson Romais Schmildt, Prof. Dr. Aymbiré Francisco Almeida da Fonseca, Prof. Dr. Paulo Cezar Cavatte, Prof. Dr. Ruimário Inácio Coelho, a todos o meu muito obrigado pelas sugestões e contribuições para melhoria deste trabalho.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para concretização de mais uma etapa da minha formação, meus sinceros agradecimentos.

MUITO OBRIGADO A TODOS!!!

*Se clamares por conhecimento, e por inteligência alçares a tua voz,
Se como a prata a buscares e como a tesouros escondidos a procurares,
Então entenderás o temor do Senhor, e acharás o conhecimento de Deus.*

Provérbios 2:3-6

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
1. INTRODUÇÃO GERAL	22
2. OBJETIVO GERAL.....	24
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
3.1 <i>Crambe abyssinica</i> HOCHST.....	25
3.1.1 Descrição da Espécie.....	25
3.1.2 Origem e Distribuição Geográfica.....	26
3.1.3 Aspectos Morfo-anatômicos.....	26
3.1.4 Características Agronômicas.....	28
3.1.5 Importância Sócio-econômica.....	29
3.2 MICROPROPAGAÇÃO EM ESPÉCIES OLEAGINOSAS.....	31
3.2.1 Papel da Micropropagação em Espécies Oleaginosas.....	32
3.2.2 Micropropagação de <i>Crambe abyssinica</i> Hochst.....	34
3.3 O USO DE MARCADORES MOLECULARES EM ESTUDOS DE ESTABILIDADE GENÉTICA VEGETAL EM PLANTAS MICROPROPAGADAS.....	35
3.3.1 Marcadores Moleculares.....	37
3.3.2 Estabilidade Genética Vegetal e Variação Somaclonal.....	40
3.3.3 Avaliação da Estabilidade Genética Vegetal no Cultivo <i>in vitro</i>	41
3.4 ANATOMIA VEGETAL DE PLÂNTULAS <i>IN VITRO</i>	47
3.4.1 Alterações Anatômicas <i>in vitro</i>	47

3.4.2 Problemas Causados pelas Alterações Anatômicas <i>in vitro</i>	49
3.4.3 Anatomia <i>in vitro</i> de <i>Crambe abyssinica</i>	49
4. REFERÊNCIAS	51
CAPÍTULO I: Germinação <i>in vitro</i> de <i>Crambe abyssinica</i> Hochst.....	69
RESUMO.....	70
ABSTRACT.....	71
1. INTRODUÇÃO.....	72
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	73
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
4. CONCLUSÕES.....	82
5. REFERÊNCIAS.....	82
CAPÍTULO II: Micropropagação de <i>Crambe abyssinica</i> Hochst.....	86
RESUMO.....	87
ABSTRACT.....	88
1. INTRODUÇÃO.....	89
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	91
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	93
4. CONCLUSÕES.....	109
5. REFERÊNCIAS.....	109
CAPÍTULO III: Estabilidade genética de plantas micropropagadas de <i>Crambe abyssinica</i> Hochst utilizando marcadores ISSR.....	117
RESUMO.....	118
ABSTRACT.....	119
1. INTRODUÇÃO.....	120
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	122
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	125
4. CONCLUSÕES.....	138
5. REFERÊNCIAS.....	139

CAPÍTULO IV: Anatomia foliar de <i>Crambe abyssinica</i> Hochst cultivadas <i>in vivo</i>, <i>in vitro</i> e durante a aclimatização.....	150
RESUMO.....	151
ABSTRACT.....	152
1. INTRODUÇÃO.....	153
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	154
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	157
4. CONCLUSÕES.....	174
5. REFERÊNCIAS.....	174
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	181

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagens de plantas de crambe: plantas em desenvolvimento (A e B), sementes em germinação (C), detalhe das folhas (D) e florescimento (E).....27

Figura 2 - Planta de crambe: A) parte inferior e superior da planta em fase de frutificação; B) flor; C) fruto; D) corte longitudinal da parte superior do fruto.....28

Capítulo II

Figura 1 - Regeneração de *C. abyssinica* através de segmentos apicais. (A) Planta germinada *in vitro*; (B e C) Segmento apical utilizado como explante (0 dias); (D e E) Brotos induzidos com 5,0 μM BAP aos 30 e 60 dias, respectivamente; (F e G) Enraizamento de brotos com 0,5 μM ANA aos 120 dias.....94

Figura 2 - Regressão polinomial dos valores médios do número de brotos por explante (NBE) de plântulas de *C. abyssinica* submetidas a diferentes níveis de citocininas após 30 dias (A) e 60 dias (B) de cultivo *in vitro*.....97

Figura 3 - Regressão polinomial dos valores de comprimento médio dos brotos (CMB) de plântulas de *C. abyssinica* submetidas a diferentes níveis de citocininas após 30 dias (A) e 60 dias (B) de cultivo *in vitro*.....99

Figura 4 - Regressão polinomial dos valores de massa fresca total (MF) de plântulas de *C. abyssinica* submetidas a diferentes níveis de citocininas após 30 dias (A) e 60 dias (B) de cultivo *in vitro*.....102

Capítulo III

Figura 1 - Regeneração de *C. abyssinica* por meio de segmentos apicais. (A) Planta germinada *in vitro*; (B) Segmento apical utilizado como explante (0 dias); (C, D e E) Brotos induzidos com 5,0 μM BAP aos 30, 60 e 90 dias, respectivamente; (F) Brotos induzidos com 3,0 μM BAP aos 120 dias; (G e H) Enraizamento com 0,5 μM ANA (150 dias) (tratamento de origem: 3,0 μM BAP).....126

Figura 2 - Amplificações produzidas utilizando *primers* UBC 810 (A), UBC 827 (B), UBC 834 (C), UBC 841 (D), UBC 849 (E), UBC 855 (F), UBC 857 (G), UBC 859 (H), UBC 864 (I) e UBC 890 (J). M – Marcador de peso molecular; D - DNA da planta-mãe; 1 a 8 - DNA de plantas regeneradas no tratamento 3 μ M BAP; 9-10 - DNA de plantas regeneradas no tratamento 1 μ M BAP + 0,5 μ M ANA.....135

Capítulo IV

Figura 1 - Secção transversal do mesofilo (A-D) e da nervura central (E-H) de folhas de *C. abyssinica in vivo* (30 dias) (A e E), *in vitro* (30 dias) (B e F) e durante a aclimatização 01 (30 dias) (C e G) e 02 (60 dias) (D e H).....159

Figura 2 - Secção transversal do mesofilo (A-C) de folhas de *C. abyssinica in vitro* aos 30 dias, submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de citocininas. A: 0 μ M; B: 5 μ M; C: 10 μ M.....170

Figura 3 - Secção transversal do mesofilo de folhas de *C. abyssinica in vitro* aos 60 dias, submetidas a tratamentos com diferentes citocininas e concentrações. A: 5 μ M BAP; B: 5 μ M CIN; C: 5 μ M TDZ; D: 10 μ M BAP; E: 10 μ M CIN; F: 10 μ M TDZ.....174

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1 - Resumo da análise de variância para porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de plântulas normais (%PN), comprimento de parte aérea (PA), comprimento de raiz (CR) e massa fresca total (MF) de *C. abyssinica* após 10 dias de inoculação.....75

Tabela 2 - Porcentagem de germinação de sementes de *C. abyssinica* em diferentes meios de cultura, dez dias após inoculação.....76

Tabela 3 - Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *C. abyssinica* em diferentes meios de cultura e condições físicas da semente, avaliados durante dez dias após inoculação.....77

Tabela 4 - Comprimento da parte aérea (cm) de plântulas de *C. abyssinica* em diferentes meios de cultura e condições luminosas, dez dias após inoculação.....78

Tabela 5 - Comprimento da parte aérea (cm) de plântulas de *C. abyssinica* em diferentes meios de cultura e condições físicas da semente, dez dias após inoculação.....79

Tabela 6 - Comprimento de raiz (cm) de plântulas de *C. abyssinica* em diferentes meios de cultura, dez dias após inoculação.....80

Tabela 7 - Massa fresca total (g) de plântulas de *C. abyssinica* em diferentes meios de cultura, dez dias após inoculação.....82

Capítulo II

Tabela 1 - Resumo da análise de variância para número de brotos por explante (NBE), comprimento médio dos brotos (CMB), massa fresca total (MF) e porcentagem de sobrevivência (%Sobrev.) de plântulas de *C. abyssinica* sob interação de diferentes níveis de BAP, CIN e TDZ após 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*.....95

Tabela 2 - Média do número de brotos por explante (NBE) de plântulas de <i>C. abyssinica</i> sob diferentes citocininas após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i>	96
Tabela 3 - Média do número de brotos por explante (NBE) de plântulas de <i>C. abyssinica</i> sob interação de diferentes citocininas e níveis após 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	96
Tabela 4 - Comprimento médio dos brotos (CMB) (cm) de plântulas de <i>C. abyssinica</i> sob interação de diferentes citocininas e níveis após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i>	98
Tabela 5 - Comprimento médio dos brotos (CMB) (cm) de plântulas de <i>C. abyssinica</i> sob interação de diferentes citocininas e níveis após 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	99
Tabela 6 - Massa fresca total (MF) (g) de plântulas de <i>C. abyssinica</i> sob diferentes citocininas após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i>	101
Tabela 7 - Massa fresca total (MF) (g) de plântulas de <i>C. abyssinica</i> sob interação de diferentes citocininas e níveis após 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	101
Tabela 8 - Resumo da análise de variância para comprimento médio dos brotos (CMB) (cm) e porcentagem de sobrevivência (%Sobrev.) de plântulas de <i>C. abyssinica</i> , provenientes dos tratamentos com BAP e TDZ, submetidas ao alongamento 1 μ M de GA3 aos 90 dias de cultivo <i>in vitro</i>	104
Tabela 9 - Resumo da análise de variância para porcentagem de enraizamento (%Enraiz.) e porcentagem de sobrevivência (%Sobrev.) de plântulas de <i>C. abyssinica</i> , provenientes dos tratamentos com BAP e TDZ a 5 μ M, submetidas ao enraizamento com ANA e AIA, nas concentrações de 0,0; 0,25 e 0,50 μ M aos 120 dias de cultivo <i>in vitro</i>	106
Tabela 10 - Porcentagem de enraizamento (%Enraiz.) de plântulas de <i>C. abyssinica</i> , provenientes dos tratamentos com BAP e TDZ a 5 μ M, submetidas ao enraizamento com ANA e AIA, nas concentrações de 0,0; 0,25 e 0,50 μ M aos 120 dias de cultivo <i>in vitro</i>	106

Capítulo III

Tabela 1 - Média do número de brotos por explante (NBE), comprimento médio dos brotos (CMB) e porcentagem de sobrevivência (%Sobrev.) em segmentos apicais de *C. abyssinica* sob a concentração 5,0 µM de BAP após 30, 60 e 90 dias de cultivo *in vitro*.....127

Tabela 2 - Resumo da análise de variância para número de brotos por explante (NBE), comprimento médio dos brotos (CMB), porcentagem de enraizamento (%Enraiz.) e porcentagem de sobrevivência (%Sobrev.) de plântulas de *C. abyssinica* sob interação de diferentes concentrações de BAP e ANA após 120 dias de cultivo *in vitro*.....128

Tabela 3 - Média do número de brotos por explante (NBE) de plântulas de *C. abyssinica* sob interação de diferentes concentrações de BAP e ANA após 120 dias de cultivo *in vitro*.....129

Tabela 4 - Comprimento médio dos brotos (CMB) de plântulas de *C. abyssinica* sob diferentes concentrações de BAP após 120 dias de cultivo *in vitro*.....130

Tabela 5 - Porcentagem de enraizamento (%Enraiz.) de plântulas de *C. abyssinica* sob diferentes concentrações de BAP após 120 dias de cultivo *in vitro*.....131

Tabela 6 - Porcentagem de enraizamento (%Enraiz.) de plântulas de *C. abyssinica* sob diferentes concentrações de ANA após 120 dias de cultivo *in vitro*.....131

Tabela 7 - Porcentagem de sobrevivência (%Sobrev.) de plântulas de *C. abyssinica* sob diferentes concentrações de BAP após 120 dias de cultivo *in vitro*.....132

Tabela 8 - Efeito de 0,5 µM de ANA (150 dias) e 1,0 µM ANA + 0,1 µM BAP (180 dias) no número de brotos por explante (NBE), comprimento médio dos brotos (CMB) (mm), porcentagem de enraizamento (%Enraiz.) e porcentagem de sobrevivência (%Sobrev.), em plântulas de *C. abyssinica* provenientes do cultivo *in vitro* nos tratamentos com BAP e ANA.....132

Tabela 9 - Lista de diferentes *primers* UBC utilizados para a detecção da estabilidade genética de plantas regeneradas *in vitro* de *C. abyssinica*.....136

Capítulo VI

Tabela 1 - Espessura média (μm) do limbo, mesofilo, face adaxial e abaxial da epiderme, parênquima paliçádico e esponjoso, nervura central e área do feixe vascular (μm^2) de folhas de *C. abyssinica*, obtidas pela germinação *in vivo* (30 dias), *in vitro* (30 dias) e durante a aclimatização 01 (30 dias) e 02 (60 dias).....161

Tabela 2 - Resumo da análise de variância para número de brotos por explante (NBE) e comprimento médio dos brotos (CMB) de plantas de *C. abyssinica* após 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo com diferentes citocininas e concentrações.....164

Tabela 3 - Média do número de brotos por explante de plântulas de *C. abyssinica* em diferentes citocininas após 90 dias de cultivo *in vitro*.....165

Tabela 4 - Média do número de brotos por explante de plântulas de *C. abyssinica* em diferentes concentrações de citocininas após 60, 90 e 120 dias de cultivo *in vitro*.....165

Tabela 5 - Média do comprimento de brotos por explante (mm) de plantas de *C. abyssinica* em diferentes concentrações de citocininas após 30, 60 e 90 dias de cultivo *in vitro*.....166

Tabela 6 - Média do comprimento de brotos por explante (mm) de plantas de *C. abyssinica* em diferentes citocininas e concentrações após 120 dias de cultivo *in vitro*.....167

Tabela 7 - Resumo da análise de variância para a espessura (μm) do limbo, mesofilo, face adaxial e abaxial da epiderme, parênquima paliçádico e esponjoso, nervura central e área (μm^2) do feixe vascular de folhas de *C. abyssinica*, obtidas pelo cultivo *in vitro* com diferentes citocininas e concentrações após 30 dias.....168

Tabela 8 - Espessura média (μm) da face adaxial da epiderme (FD) e do parênquima paliçádico (PP) de folhas de *C. abyssinica*, obtidas pelo cultivo *in vitro* com diferentes concentrações de citocininas após 30 dias.....169

Tabela 9 - Resumo da análise de variância para a espessura (μm) do limbo, mesofilo, face adaxial e abaxial da epiderme, parênquima paliçádico e esponjoso, nervura central e área

(μm^2) do feixe vascular de folhas de *C. abyssinica*, obtidas pelo cultivo *in vitro* com diferentes citocininas e concentrações após 120 dias.....171

Tabela 10 - Espessura média (μm) do mesofilo de folhas de *C. abyssinica*, obtidas pelo cultivo *in vitro* com diferentes citocininas e concentrações após 120 dias.....172

Tabela 11 - Espessura média (μm) do parênquima paliçádico de folhas de *C. abyssinica*, obtidas pelo cultivo *in vitro* com diferentes citocininas e concentrações após 120 dias.....172

Tabela 12 - Espessura média (μm) da face adaxial da epiderme de folhas de *C. abyssinica*, obtidas pelo cultivo *in vitro* com diferentes concentrações de citocininas após 120 dias.....173

RESUMO

Crambe (*Crambe abyssinica*) pertence à família Brassicaceae, originário da Etiópia e principalmente destinado à produção de forragem (30 a 32% de proteína bruta). Atualmente, tem sido bastante cultivado visando à extração de óleo vegetal. Com os atuais incentivos à busca de fontes de energias renováveis, o cultivo de crambe vem ganhando papel de destaque na produção de biodiesel por suas diversas vantagens, como: (a) rápido ciclo de vida (colhida em torno de 90 dias); (b) alta produção de biomassa; (c) alta produtividade de sementes (1000 e 1500 kg ha⁻¹); (d) menor custo de produção em relação a outras fontes oleaginosas, como, canola, girassol e soja; (e) um percentual de óleo total na semente entre 32 e 38%, superando, por exemplo, a soja; (f) potencial de fitorremediação, eficiente na descontaminação de arsênio, cromo e outros metais pesados; e (g) elevado percentual de ácido erúico (50 a 60%) sendo útil na indústria de plástico e lubrificante. Devido aos poucos trabalhos realizados com crambe, abre-se um vasto campo de investigações científicas que tenham como objetivo desenvolver as potencialidades dessa cultura e, conseqüentemente, melhorar os aspectos agrônômicos e tecnológicos para seu emprego na indústria de biodiesel. Nesse contexto, as técnicas de cultivo *in vitro* foram importantes tanto para a propagação massal, quanto como ferramenta para uma possível aplicação de outras técnicas biotecnológicas, contribuindo para uma produção homogênea, fiel e em larga escala. Portanto, este trabalho teve como objetivo geral avaliar as condições mais favoráveis à germinação, estabelecimento *in vitro* e micropropagação de *Crambe abyssinica* Hochst., além de verificar possíveis alterações genéticas e anatômicas, possibilitando a regeneração e produção de plântulas viáveis. Para a germinação e estabelecimento *in vitro* de crambe, as condições mais favoráveis foram em meio B5 ou WPM, na presença ou ausência de pericarpo e na presença de luz. Na micropropagação dessa espécie, uma frequência satisfatória de regeneração de brotos foi obtida a partir de segmentos apicais utilizados como explante em meio contendo 5 µM de BAP (6-benzilaminopurina), e o alongamento foi satisfatório com 1 µM de GA₃ (ácido giberélico). Os marcadores moleculares ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*) utilizados para a análise da estabilidade genética indicaram que o segmento apical de crambe é um explante confiável para a micropropagação de plantas geneticamente verdadeiras (*true-to-type*), ou seja, mantém a estabilidade genética. As diversas fontes de citocininas e concentrações utilizadas neste trabalho não promoveram mudanças, no sentido de alterar a organização e/ou a espessura em relação ao controle, e as alterações observadas na estrutura e espessura das folhas dos tratamentos de aclimatização prejudicaram o processo de estabelecimento da plântula *ex vitro*.

Contudo, existe a necessidade de um enraizamento e aclimatização eficiente para completa propagação *in vitro* de crambe. Portanto, este protocolo de regeneração de plantas *in vitro* de crambe pode ser útil no processo de criação e desenvolvimento de novas cultivares em um tempo mais curto e no melhoramento genético usando explantes apicais.

Palavras-chaves: crambe, biodiesel, *in vitro*, reguladores de crescimento.

ABSTRACT

Crambe (*Crambe abyssinica*) belongs to the Brassicaceae family, originally from the Ethiopia and primarily designed for forage production (30-32% crude protein). Currently, it has been largely cultivated for extraction of vegetable oil. With the current incentives to the search for renewable energy sources, the cultivate of crambe has gained a prominent role in the production of biodiesel for its various advantages, such as: (a) rapid life cycle (harvested around 90 days); (b) high biomass production; (c) high seed crop (1000 and 1500 kg ha⁻¹); (d) lower production cost compared to other oil sources, such as, canola, sunflower and soybean; (e) a percentage of total seed oil between 32 and 38%, surpassing, for example, the soybean; (f) potential for phytoremediation, effective in the decontamination of arsenic, chrome and other heavy metals; and (g) a high percentage of erucic acid (50 to 60%) being useful in lubricant and plastic industry. Because of the few studies with crambe opens up a vast camp of scientific research that aim to develop the potential of this crop and, hence, improve the agronomic and technological aspects to its use in the biodiesel industry. In this context, the techniques of *in vitro* culture were important for mass propagation, and as a tool for a possible application of other biotechnological techniques, contributing to a homogeneous, true and large scale production. Therefore, this study aimed to evaluate the general conditions more favorable for *Crambe abyssinica* Hochst. germination, establishment *in vitro* and micropropagation. To investigate possible genetic and anatomical changes enabling regeneration and production of viable seedlings. For *in vitro* germination and establishment of crambe, the most favorable conditions were in B5 or WPM medium, in the presence or absence of the pericarp and in the presence of light. In micropropagation of this species, a satisfactory frequency of shoot regeneration was obtained from shoot tip used as explants in medium containing 5 µM BAP (6- benzylaminopurine), and the elongation was satisfactory with 1 µM of GA₃ (gibberellic acid). The ISSR (Inter-Simples Sequence Repeats) molecular markers used for genetic analysis indicated that the stability shoot tip crambe is a reliable explant for micropropagation of plants genetically true-to-tipe, maintains genetic stability. The various sources of cytokinins and concentrations used in this study did not cause changes, in way to change the organization and/or thickness compared to control, and that the observed changes in the structure and thickness of the leaves of acclimatization treatments hindered the process *ex vitro* establishment of seedlings. However, there is a need for an efficient rooting and acclimatization for full *in vitro* propagation of crambe. Therefore, this protocol for *in*

in vitro plant regeneration of crambe may be useful in the process creation and development of new cultivars in a shorter time and in genetic improvement using shoot tips explants.

Key Words: crambe, biodiesel, *in vitro*, growth regulators.

1- INTRODUÇÃO GERAL

A crescente demanda por combustíveis renováveis como alternativa aos combustíveis fósseis, associada à preocupação internacional com o aquecimento global, evidencia os benefícios dos biocombustíveis, como o biodiesel, contribuindo para minimizar as condições ambientais a partir da redução da emissão de gases poluentes (GRANDO, 2005).

A produção de biodiesel nacional encontra-se alicerçada em culturas anuais, principalmente de ciclo primavera/verão. Para a continuidade dessa produção durante o ano, são poucas as espécies alternativas no outono/inverno, que desempenhem, também, papel na rotação de cultura (EMBRAPA, 2004). No Brasil, a principal matéria-prima para a produção de óleo é a soja, responsável por mais de 70% do biodiesel produzido no país (BRASIL, 2009).

Nesse sentido, há uma busca por novas oleaginosas pouco conhecidas no Brasil, como o crambe (*Crambe abyssinica* Hochst.), ou conhecidas, mas não trabalhadas para a produção de óleo, como o nabo-forrageiro (*Raphanus sativus*) e o pinhão-manso (*Jatropha curcas*), despontando como alternativas interessantes para a produção de biodiesel (WANG et al., 2000; ROSCOE; RICHETTI; MARANHO, 2007).

Crambe pertence à família Brassicaceae e originário da Etiópia, sendo extensamente plantado no México e Estados Unidos. Trata-se de uma espécie destinada basicamente à produção de forragem (30 a 32% de proteína bruta), que tem sido bastante cultivada atualmente visando à extração de óleo vegetal (NEVES et al., 2010).

Com os atuais incentivos à busca de fontes de energias renováveis, a cultura de crambe vem ganhando papel de destaque na produção de biodiesel por suas diversas vantagens, como: (a) rápido ciclo de vida (colhida em torno de 90 dias), (b) alta produção de biomassa, (c) alta produtividade de sementes (1000 e 1500 kg ha⁻¹), (d) baixo custo de produção e (e) um percentual de óleo total na semente entre 32 e 38%, superando, por exemplo, o percentual da soja (PAULOSE; KANDASAMY; DHANKHER, 2010). Jasper, Biaggioni e Silva (2010) demonstraram que a cultura do crambe apresenta menor custo de produção em relação a outras fontes oleaginosas, como, canola, girassol e soja.

Além do biodiesel, a cultura de crambe tem potencial de fitorremediação, sendo eficiente na descontaminação de arsênio, cromo e outros metais pesados (ARTUS, 2006). Em virtude do elevado percentual de ácido erúico (50 a 60%), pode ser útil na indústria de plástico e lubrificante (PITOL, 2008).

Apesar da importância econômica e emprego na agroenergia, poucos trabalhos foram realizados com crambe. Assim, abre-se um vasto campo para investigações que tenham como objetivo desenvolver as potencialidades dessa espécie e, conseqüentemente, melhorar os aspectos agrônômicos e tecnológicos para seu emprego na indústria de biodiesel.

De acordo com as normas internacionais de qualidade, para o aumento na produção de biodiesel, é necessário buscar novas oleaginosas que produzam óleos não comestíveis (JEFFERSON, 2006). Para isso, uma produção homogênea e em larga escala é necessária. Nesse contexto, as técnicas de cultivo *in vitro* são importantes tanto para a propagação massal, quanto como ferramenta para aplicação de outras técnicas biotecnológicas.

Diferentes protocolos de estabelecimento e regeneração *in vitro* de *C. abyssinica* foram descritos utilizando técnicas de micropropagação. Li et al. (2010; 2011), utilizando segmentos de hipocótilos e Gao et al. (1998) a partir de células em cultura, descreveram protocolos de regeneração via organogênese direta. Palmer e Keller (2011), trabalhando com segmentos de hipocótilos, de raiz e cotilédones relataram um protocolo de regeneração via embriogênese somática indireta.

Apenas o protocolo desenvolvido por Li et al. (2011) obtiveram taxa de regeneração satisfatória (95%), viabilizando estudos relacionados ao melhoramento genético da espécie como a transgenia e a hibridização somática (WANG; LUO, 1998; WANG; SONNTAG; RUDLOFF, 2003; WANG et al., 2004). Entretanto, estudos relacionados à estabilidade genética e efeitos na anatomia da folha das plantas regeneradas ainda não foram descritos e são necessários para tornar a técnica de micropropagação viável para fins comerciais.

2- OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar as condições mais favoráveis à germinação, estabelecimento *in vitro* e micropropagação de *Crambe abyssinica* Hochst., além de verificar possíveis alterações genéticas e anatômicas, possibilitando a regeneração e produção de plântulas viáveis.

2.1- Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de diferentes meios de cultura (MS, WPM e B5), condição física das sementes (com e sem pericarpo) e condições de luminosidade na sala de crescimento (luz e escuro) no estabelecimento das plântulas *in vitro* a partir da germinação de sementes;
- Analisar o efeito das citocininas BAP (6-benzilaminopurina), CIN (cinetina) e TDZ (tidiazuron) (tipo e concentração) sobre a taxa de indução de brotos durante os processos de subcultivos para a organogênese direta visando a micropropagação da cultura;
- Estimular o alongamento da parte aérea dos brotos regenerados com ácido giberélico (GA₃);
- Induzir a formação de raízes adventícias com auxinas (AIA-ácido 3-indolacético e ANA-ácido 1-naftalenoacético) em diferentes concentrações;
- Diminuir a dose de citocininas após o segundo subcultivo, adicionando ainda uma auxina numa concentração padrão para melhorar a indução radicular;
- Determinar condições adequadas para a aclimatização das plantas regeneradas;
- Avaliar a estabilidade genética das plantas micropropagadas utilizando a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) baseada em marcadores moleculares ISSRs (*Inter Simple Sequence Repeats* – Sequências simples repetitivas internas);
- Avaliar as características anatômicas das folhas de crambe em diferentes estádios: plântulas germinadas *in vivo*, *in vitro* e durante a aclimatização; nos tratamentos com as citocininas BAP, CIN e TDZ nas concentrações de 0, 5 e 10 µM após 30 e 120 dias de cultivo.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- *Crambe abyssinica* Hochst

3.1.1- Descrição da Espécie

O crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) é uma oleaginosa da família das Brassicaceae, antes conhecida como Cruciferae ou crucíferas (FALASCA et al., 2010). O gênero *Crambe* possui 39 espécies conhecidas, e *Crambe abyssinica* Hochst enquadra-se na seção Leptocrambe, o qual possui uma base genética estreita, dificultando o melhoramento genético (WARWICK; GUGEL, 2003).

A família Brassicaceae possui integrantes com finalidades oleíficas semelhantes ao crambe, como a colza (*Brassica napus* L. var. oleífera), canola (*B. napus*) e mostarda (*B. juncea*; *B. campestris*; *B. alba*; *B. nigra*) (DESAI, 2004; FUNDAÇÃO MS, 2013). Além dessas, muitas espécies da família são cultivadas como plantas hortícolas e foram introduzidas no Brasil, a exemplo do Repolho (*B. Oleracea* var. capitata), Couve (*B. oleracea* var. acephala), Couve-flor (*B. oleracea* var. botrytis), Brócolis (*B. oleracea* var. itálica), Couve-chinesa (*B. pekinensis*), Couve-rábano (*B. Oleracea* var. gongylodes), Couve-de-bruxelas (*B. Oleracea* var. gemmifera), Couve-tronchuda (*B. oleracea* var. tronchuda), Rúcula (*Eruca sativa*), Agrião aquático (*Rorippa nasturtium-aquaticum*) e Rabanete (*Raphanus sativus*) (MOREIRA; BRAGANÇA, 2010).

As espécies da família Brassicaceae são conhecidas por sua grande variação no número de cromossomos e a ocorrência frequente de poliploidias (MARHOLD et al., 2010). Um exemplo estudado é o de *Crambe abyssinica*, sendo descrita como uma espécie hexaploide ($2n = 6x = 90$) (WHITE; SOLT, 1978), de origem autoploiploide e apresenta baixos níveis de variação genética (ANDERSON; WARWICK, 1999), sendo essencialmente autógama (autopolinizada), contudo Vollmann e Ruckebauer (1991) revelaram que cerca de 15% da polinização ocorre de forma cruzada.

3.1.2- Origem e Distribuição Geográfica

O crambe é originário da Etiópia e domesticado na região do Mediterrâneo (KNIGHTS, 2002), com relatos de ocorrência de algumas espécies da Etiópia à Tanzânia (WEISS, 2000). Sendo adaptado ao clima frio (FALASCA et al., 2010) e a regiões de temperaturas mais elevadas (DAHLKE; SIMONETTI, 2010) das amplas extensões da Europa.

Apenas uma pequena parte da sua história, principalmente relacionada à colheita, é conhecida. Seu cultivo provavelmente começou na extinta União das Repúblicas Socialistas Soviéticas (URSS) (MASTEBROEK et al., 1994), e atualmente, é cultivado em maior escala no México e nos Estados Unidos da América (EUA), com finalidade para a produção de óleo industrial (ECHEVENGUÁ, 2007).

No Brasil, as pesquisas com a espécie do crambe iniciaram-se no ano de 1995 pela Fundação MS no Estado de Mato Grosso do Sul, município de Maracaju – MS, com o objetivo de avaliar o seu comportamento como cultivo para cobertura de solo em sistemas de plantio direto (MULLER, 2008; DAHLKE; SIMONETTI, 2010). Devido suas exigências climáticas, a região Centro-Sul do Mato Grosso do Sul, Norte/Nordeste do Paraná e Sul de São Paulo apresentaram-se como melhor adaptação com viabilidade de cultivo comercial (PITOL, 2008).

A cultivar FMS Brilhante foi resultado de trabalho de pesquisa conduzido pela Fundação MS. Apesar de sua boa adaptação à região, de seu baixo custo e facilidade de cultivo, essa cultura não despertou maiores interesses para o cultivo, pois, em primeiro lugar, como cobertura de solo é inferior ao nabo forrageiro; em segundo lugar, apesar da produção de grãos ser satisfatória, não havia mercado para a mesma. Entretanto, com o estímulo à produção e uso de biodiesel, o crambe voltou a ser avaliado por possuir boas possibilidades de produção nessa região. Assim, foram retomados os trabalhos de pesquisa que culminaram com a recomendação dessa espécie como uma das principais culturas para a produção de biodiesel. Por conseguinte, o crambe obteve o registro da cultivar FMS Brilhante pela Fundação MS (PITOL, 2008).

3.1.3- Aspectos Morfo-anatômicos

Crambe é uma planta herbácea de ciclo anual, com aproximadamente um metro de altura, podendo ultrapassar esses valores dependendo da época e da densidade de plantio

(PEREZ, 1998; COLODETTI et al., 2012) (Figura 1A, B e 2A). Suas hastes ramificam-se próximas ao solo para formar trinta ou mais galhos, que novamente se ramificam, formando galhos terciários (Figura 1E e 2A) (DESAI; KOTECHA; SALUNKHE, 1997). O sistema radicular é pivotante e profundo (COLODETTI et al., 2012).

As folhas são grandes, largas, ovais e assimétricas (Figura 1D) (TOEBE et al., 2010). A lâmina foliar possui aproximadamente 10 cm de comprimento e 7,6 cm de largura, com superfície lisa. O pecíolo possui aproximadamente 20 cm de comprimento e é pubescente (Figura 2A) (OPLINGER et al., 2000).

O tipo de inflorescência (Figura 1E, 2A) é racimo, com flores da cor branca ou amarela (Figura 2B) e os frutos do tipo cápsula (Figura 2C e D) (FALASCA et al., 2010). O grão é redondo, com 2 mm de diâmetro e de cor marrom claro (Figura 1C, 2C e D) (COLODETTI et al., 2012). A semente (Figura 1C e 2C e D) possui forma esférica com 0,8-2,6 mm de diâmetro (FALASCA et al., 2010) e é envolvida por uma estrutura tegumentar denominada pericarpo ou cápsula (PEREZ, 1998).

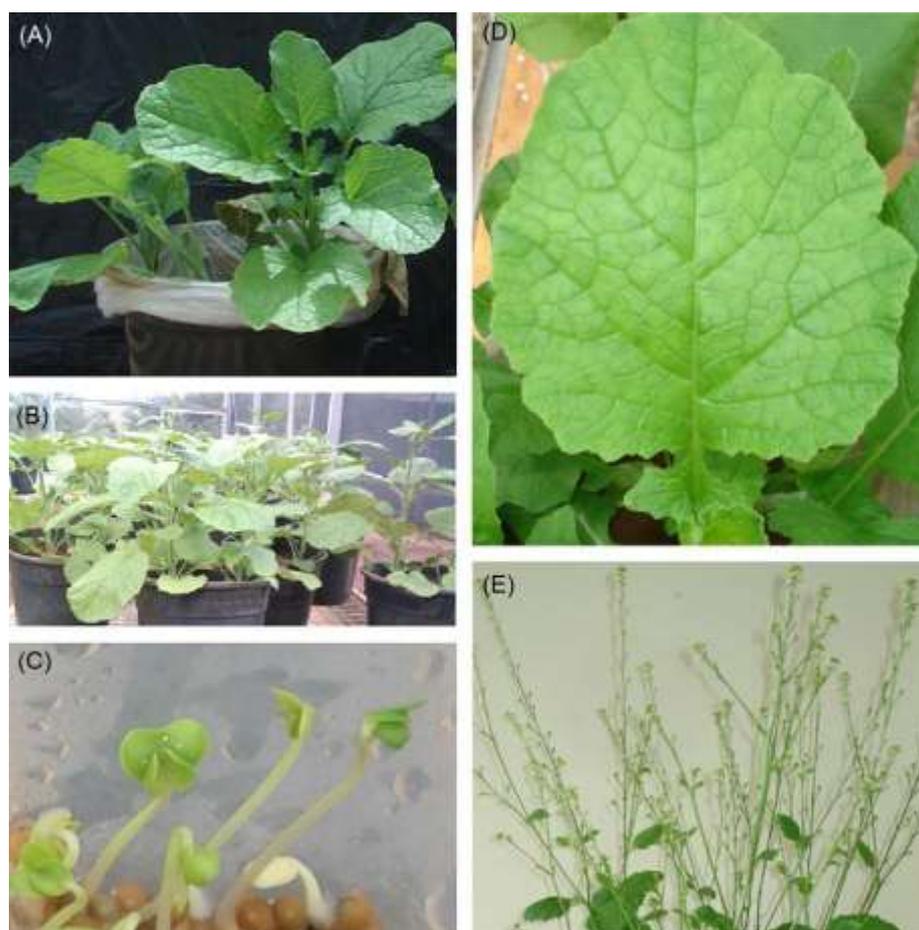


Figura 1- Imagens de plantas de crambe: plantas em desenvolvimento (A e B), sementes em germinação (C), detalhe das folhas (D) e florescimento (E) (Fonte: COLODETTI et al., 2012).

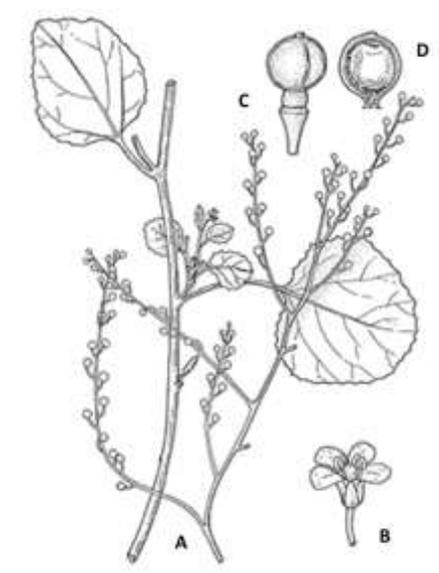


Figura 2- Planta de crambe: A) parte inferior e superior da planta em fase de frutificação; B) flor; C) fruto; D) corte longitudinal da parte superior do fruto (Fonte: www.prota.org).

3.1.4- Características Agronômicas

Com baixo custo de produção, o crambe pode ser cultivado em várias regiões de clima tropical e subtropical (PITOL, 2008; DAHLKE; SIMONETTI, 2010). Com ciclo curto e tolerância à seca e às baixas temperaturas (MULLER, 2008), pode ser plantada em épocas que os riscos para as demais culturas de safrinha seriam muito elevados na região Centro Oeste do Brasil (PITOL; BROCH; ROSCOE, 2010).

A referida espécie pode crescer em locais com precipitação média anual de 350 a 1200 mm, a uma temperatura média anual na faixa de 5,7 a 16,2 °C e solos com pH de 5,0-7,8 (IENICA, 2002). A colheita é feita normalmente em condições de sequeiro e sem irrigação complementar. As raízes podem chegar a mais de 15 centímetros de profundidade, o que confere à planta grande tolerância a períodos de deficiência hídrica do solo. No entanto, não tolera solos muito húmidos ou encharcados, solos ácidos e com alumínio tóxico. Para seu cultivo, os solos devem ser eutróficos ou corrigidos (FUNDAÇÃO MS, 2013). A planta não se desenvolve bem em solos rochosos ou sem profundidade suficiente. As sementes são moderadamente tolerantes a solos salinos durante a germinação, em temperatura moderada entre 10 a 30°C (FALASCA et al., 2010). O seu ciclo é muito curto, uma vez que floresce em 35 dias e pode ser colhida em 90 dias. Sua maturação é uniforme, o que propicia colheita mecanizada (CASTLEMAN; PYMER; GREENWOOD, 1999).

Em condições de baixa umidade após a fase de florescimento, o crambe não apresenta pragas e doenças graves, embora seja susceptível à esclerotínia e antracnose. O plantio pode ser feito com plantadoras de soja e semeadoras para sementes pequenas. Deve-se ter muito cuidado com invasoras de folha larga, pois não há herbicidas seletivos para o seu controle. A época de plantio depende da duração do período chuvoso em cada região. Os espaçamentos entre linhas devem ser de 17 a 50 cm. Espaçamentos menores melhoram a competição da cultura com as ervas invasoras, enquanto os maiores melhoram o arejamento da lavoura e evita o acamamento em condições muito favoráveis ao desenvolvimento da planta. O estande de plantas varia entre 80 e 120 plantas m^{-2} (20 a 30 plantas m^{-1}), o que representa de 12 a 15 $kg\ ha^{-1}$ de sementes para plantio (FUNDAÇÃO MS, 2013).

O rendimento de grãos varia entre 1.125-1.622 $kg\ ha^{-1}$ na Rússia, 450-2.522 $kg\ ha^{-1}$ nos EUA. Na Europa, com diferentes situações ambientais e com ampla gama de cultivares, o rendimento médio é de 2.353 $kg\ ha^{-1}$, ou 846 kg de óleo contendo uma média de 57,8% de ácido erúico (FALASCA et al., 2010). Pode apresentar rendimentos mais elevados em terras livres de ervas daninhas. Os rendimentos em campos fertilizados com nitrogênio e irrigados podem chegar a até 5.000 $kg\ ha^{-1}$. Na Itália, a cultivar “Mario” produziu rendimentos de sementes superiores a 4.000 $kg\ ha^{-1}$ (FILA et al., 2002), já na Áustria, foram relatados valores de rendimento 970-3.330 $kg\ ha^{-1}$, com um teor de óleo na semente de 23-38% (VOLLMANN; RUCKENBAUER, 1993). No Brasil, pesquisadores da Fundação MS relataram produção de 1.000-1.500 $kg\ ha^{-1}$ (FUNDAÇÃO MS, 2008).

Ainda no Brasil, é considerado um vegetal muito robusto, consegue se desenvolver em condições climáticas antagônicas, suportando desde geadas típicas do sul do país até climas quentes e secos como do centro-oeste do país (MACHADO et al., 2007).

Plantado no período de safrinha no Brasil, o crambe se destaca por boa adaptação, rusticidade, precocidade e bom potencial produtivo, em média, 1.500 $kg\ ha^{-1}$, resultando com aproximadamente 570 kg de óleo e com investimento aproximado de R\$ 300,00 por hectare (FUNDAÇÃO MS, 2008).

3.1.5- Importância Sócio-econômica

O objetivo inicial de se estudar e implantar a cultura de crambe no Brasil era como cobertura de solo para plantio direto e rotação de cultura. Anos mais tarde, as pesquisas foram retomadas para a produção de biodiesel (PITOL, 2008).

A rotação de culturas tem reconhecimento acentuado, do ponto de vista técnico, como fator significativo ao bom desenvolvimento de uma agricultura mais estável (FONTANELI et al., 2000). Portanto, essa cultura se enquadra com facilidade na realização do planejamento de rotação de culturas. O crambe é uma cultura de inverno muito recomendada a fim de evitar problemas com insetos e doenças, fazendo a rotação com trigo, sorgo, aveia e soja (MÖLLER, 2007). Sendo uma cultura totalmente mecanizada, utilizando as mesmas estruturas de soja (plantadoras, colhedoras, armazéns etc.), o crambe tem um grande potencial de expansão como alternativa de segunda safra em boa parte do Centro Oeste do Brasil (ROSCOE; DELMONTES, 2008).

Segundo Vedana (2007), o crambe é uma alternativa como matéria-prima para a produção de biodiesel, tendo em vista que a planta possui elevado conteúdo oleaginoso (SOUZA et al, 2009). A extração do óleo pode ser feita de forma mecânica, com extrusora e prensa. Segundo Pitol (2008), vários testes já comprovaram que o óleo de crambe tem boa qualidade para a produção de biodiesel.

Quando empregado na produção de biodiesel, este se mostra mais resistente à degradação e apresenta elevada estabilidade à oxidação. Isso confere vantagens relacionadas ao tempo de armazenamento, sendo este um ponto extremamente importante, uma vez que a maioria do biodiesel gerado por diversos óleos vegetais não apresenta essa estabilidade (BISPO et al., 2010).

Segundo Oplinger et al. (2000), o óleo extraído da semente de crambe pode ser usado como lubrificante industrial, inibidor de corrosão, e como ingrediente na fabricação de borracha sintética, além de servir para a fabricação de filmes plásticos, plastificantes, nylon, adesivos, antiestático, e isolamento elétrico. O óleo refinado tem uso farmacêutico, na produção de cosméticos e ceras (PITOL; BROCH; ROSCOE, 2010), bem como na alimentação de pescado (COLODETTI et al., 2012).

O subproduto da extração do óleo, a torta e/ou farelo, podem ser utilizados como suplementos proteicos em alimentação de ruminantes. O farelo apresenta excelente qualidade nutricional, com índices de até 45% de proteína bruta, com digestibilidade ruminal da matéria orgânica semelhante ao farelo de soja (CARLSON et al., 1996). O óleo de crambe não pode ser utilizado para o consumo humano, devido à presença de altos teores de ácido erúcido, um ácido graxo monoinsaturado de cadeia longa. Esse ácido provoca lesões no coração quando presente no organismo humano. Assim, esse óleo não concorre com óleos destinados ao setor alimentício (AIR, 1997). O ácido erúcido em crambe pode ter 58 e 62% (FALASCA et al., 2010), tem especial valor em tribologia como lubrificante superior, usado na manufatura de

filmes plásticos e pode ser um valioso componente para a produção de biodiesel (FAVARO et al., 2010).

3.2- Micropropagação em Espécies Oleaginosas

As espécies vegetais oleaginosas são assim classificadas por possuírem óleos e gorduras, que são extraídos, normalmente de sementes e ocasionalmente da polpa de frutos, por meio de processos adequados (ARAÚJO, 2002), oferecendo uma gama de produtos e subprodutos com utilidades em diversas áreas como, medicina, culinária, cosméticos, indústria alimentícia, farmacêutica, energética, dentre outras.

O interesse por essas espécies era, prioritariamente, por aquelas que fornecessem óleos essenciais, comestíveis ou voláteis, utilizados na indústria alimentícia, cosmética e medicinal (ALMEIDA; ROCHA FILHO; ZOGHBI, 2009). Atualmente, com a demanda energética mundial, as bioenergias, como o biodiesel de fontes animais e vegetais, o etanol proveniente da cana-de-açúcar, a biomassa florestal e os resíduos e dejetos agropecuários e da agroindústria tornaram-se importantes para o suprimento energético futuro e diminuição da dependência dos combustíveis fósseis (BELTRÃO; VALE; COSTA, 2006).

Atualmente, o grande substituto, pelo menos parcial do petróleo, é a biomassa, em especial o uso de biodiesel, que pode ser obtido via uso de óleos vegetais (BOUKOUVALAS et al., 2007), sendo uma alternativa energética renovável, biodegradável, abundante, de cultivo, produção e consumo pouco poluente (TRZECIAK et al., 2008).

De acordo com o Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011 (BRASIL, 2006), o Brasil, por se tratar de um país tropical com dimensões continentais, possui diversas alternativas para a produção de óleos vegetais com potencial de uso para fins energéticos. Culturas tradicionais como a soja, o amendoim, o girassol, o dendê e a mamona, bem como, novas alternativas, como o pinhão-manso, o nabo forrageiro, o pequi, o buriti, a macaúba e, até mesmo, o crambe, são espécies atualmente utilizadas ou cogitadas para produção de biodiesel nacional (SILVA; DUTRA, 2008).

As pesquisas com espécies oleaginosas estão sendo realizadas, sobretudo, com intuito de melhorar os aspectos agrônômicos e tecnológicos para suprir a demanda, existente e futura, da indústria de biodiesel (MILLAM et al., 1997; LEELA et al., 2011). No que diz respeito à procura por tecnologias consideradas produtivas, foram alcançados avanços altamente significativos com o uso da biotecnologia moderna, entendida como um conjunto de técnicas,

que inclui transgenia, processos enzimáticos, clonagem, micropropagação, métodos de fecundação *in vitro* et al. (CARVALHO; SILVA; MEDEIROS, 2006), as quais estão sendo utilizadas para resolver problemas de eficiência e qualidade de produtos, além de processos produtivos (CRIBB, 2004).

Portanto, para atender a enorme demanda de material vegetal com qualidade são necessários métodos eficientes de propagação vegetativa (macropropagação e micropropagação) (LEELA et al., 2011). A micropropagação é a modalidade que mais tem se difundido e encontrado aplicações práticas comprovadas dentro da cultura de tecidos vegetais (CARVALHO; SILVA; MEDEIROS, 2006), possibilitando a obtenção de plantas geneticamente idênticas, em número elevado e num breve espaço de tempo (MIMANO; MACHARIA; WASILWA, 2010).

Entre outras vantagens da micropropagação, está a independência de condições climáticas, redução da área necessária à propagação da espécie, melhores condições sanitárias, eliminação de doenças, geralmente com estabilidade genética e a propagação de espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos (ERIG; SCHUCH, 2005). Entretanto, o emprego dessa técnica em escala comercial pode ser limitado, devido, entre outros fatores, ao elevado custo, perdas causadas pela contaminação, variações fisiológicas e morfológicas nas plantas, baixa porcentagem de sobrevivência no período de aclimatização e necessidade de mão de obra especializada (KOZAI; KUBOTA, 2001).

3.2.1- Papel da Micropropagação em Espécies Oleaginosas

O principal papel da micropropagação em espécies oleaginosas está, principalmente, relacionado à eficiente propagação clonal de genótipos elite (DRAGANA et al., 2001; ABDOLI; MOIENI; DEHGHANI, 2007; AIRES et al., 2008; CARDOSO, 2010; SINGH et al., 2010; LEELA et al., 2011; SHARMA; KUMAR; REDDY, 2011). Contudo, essa técnica também é utilizada com outras finalidades, como na manutenção de coleções de germoplasma (CARVALHO et al., 2005; PACHECO et al., 2009), regeneração de protoplastos isolados e de híbridos somáticos (TASKI-AJDUKOVIC; VASIC; NAGL, 2006; MIMANO; MACHARIA; WASILWA, 2010), gerando novos híbridos e quebrando barreiras de incompatibilidade sexual, regeneração de plantas transformadas geneticamente por via direta (PARVEEZ; CHOWDHURY; SALEH, 1997; NUGENT et al., 2006; MOUSAVI et al., 2009; JOSHI; MISHRA; JHA, 2011) ou indireta (ZIA et al., 2010; IQBAL et al., 2012; CHHIKARA et al.,

2012), regeneração de explantes poliploidizados (SILVA, 2010), dentre outras finalidades (SHUKLA; SAWHNEY, 1991; MORCILLO et al., 2006; FAUGUEL et al., 2008; RADHAKRISHNAN; KUMARI, 2009; LOGANATHAN et al., 2010).

Os cultivos de espécies oleaginosas podem ser provenientes de material vegetal de programas de melhoramento genético (ZIA et al., 2010). As pesquisas de melhoramento genético tradicional são relativamente demoradas, podendo durar até 20 anos, no que se diz respeito à produção de plantas com alta qualidade e comercialmente aceitáveis. Apesar disso, esse tipo de pesquisa é um pré-requisito para a efetiva utilização de técnicas biotecnológicas, tais como a micropropagação e a engenharia genética (YASODHA; SUMATHI; GURUMURTHI, 2004).

A transferência gênica em espécies vegetais requer um eficiente protocolo para regeneração das plantas transformadas (LITTLE et al., 2000). Consequentemente, o desenvolvimento desses protocolos é a primeira etapa para a utilização desta nova tecnologia (VENTAKACHALAM et al., 1999). A micropropagação pode ser usada para aumentar a velocidade e eficiência na introdução de algumas culturas de espécies oleaginosas potenciais (LOGANATHAN et al., 2010).

O aumento do teor de óleo e de ácidos graxos em espécies oleaginosas é altamente interessante para seu uso na indústria do biodiesel. No entanto, algumas espécies respondem positivamente as técnicas de transformação genética, sendo que outras podem demonstrar dificuldades.

A embriogênese somática tem sido utilizada como ferramenta prática não só na incorporação de genes úteis, mas também como micropropagação (GRIGA, 1999). Sistemas de micropropagação, como a multiplicação de parte aérea e a embriogênese somática, empregados em espécies oleaginosas são estratégias utilizadas para o rápido ganho genético de importantes espécies oleaginosas, assim como a multiplicação em larga escala (VIDOZ, 2004).

Para que a aplicação da micropropagação torne-se viável comercialmente e possa competir com os métodos tradicionais de propagação sexuada ou assexuada (estaquia, enxertia, mergulhia, etc.), é necessário reduzir os custos de produção (ALTMAN, 1999) e/ou aumentar a eficiência do processo, justificando-se assim o uso dessa técnica em espécies oleaginosas.

3.2.2- Micropropagação de *Crambe abyssinica* Hochst

Li et al. (2010), trabalhando com hipocótilos de *C. abyssinica* cv. Galactica, descreveram um protocolo de indução direta de brotos, a partir de segmentos de hipocótilos, em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 10 μM de TDZ e 2,7 μM de ANA, promovendo a mais alta frequência de regeneração encontrada neste trabalho, até 60%.

Em um novo trabalho, Li et al. (2011) obtiveram 95% de regeneração de brotos a partir de segmentos de hipocótilo, viabilizando estudos relacionados ao melhoramento genético da espécie como a transgenia e a hibridização somática (WANG; LUO, 1998; WANG; SONNTAG; RUDLOFF, 2003; WANG et al., 2004).

Li et al. (2011) também investigaram os efeitos da fonte de nitrogênio, da fonte de carbono, do AgNO_3 , das condições culturais, assim como da concentração e combinação de reguladores de crescimento, concluíram que, dentre estes fatores, as fontes de nitrogênio e as concentrações e combinações dos reguladores de crescimento, desempenharam um papel importante na regeneração de brotos. Descrevendo que para a regeneração eficiente de brotos em hipocótilos de *C. abyssinica* cv. galactica, deve-se utilizar o meio Lepiovre (QUOIRIN et al., 1977) suplementado com 16 g L^{-1} de glicose, 0,5 g L^{-1} AgNO_3 , 2,2 mg L^{-1} de TDZ, 0,5 mg L^{-1} ANA e 2,5 g L^{-1} Gelrite.

Chhikara et al. (2012) demonstraram que a indução de calo é melhor em meios contendo 2 mg L^{-1} de BAP, 2 mg L^{-1} de ANA e 20 μM de AgNO_3 , ao passo que, meios com 2 mg L^{-1} de BAP, 0,02 mg L^{-1} de ANA e 20 μM de AgNO_3 apresentam maior eficiência na regeneração de brotos por explante, com uma frequência de 70%.

Palmer e Keller (2011) utilizaram cotilédone, hipocótilo e raiz como explantes para indução da embriogênese somática em *C. abyssinica* cv. Prophet. A frequência de formação de calo para cotilédones e hipocótilos foi de 100% nos tratamentos com 4,5 a 33,9 μM de 2,4-D e 13,0 a 39,0 μM ANA, ressaltando ainda que os explantes de raiz foram menos responsivos a esses tratamentos. Os embriões somáticos foram induzidos quando os calos foram transferidos para um meio contendo 0,56 μM de TDZ e BAP com 1,0 μM AIB. O maior número médio de embriões por calo (36) foi obtido a partir de hipocótilos submetidos a 22,6 μM de 2,4-D. Segundo os autores, os resultados indicam que os níveis elevados de auxinas são necessários para a indução de calo embriogênico, enquanto citocininas são críticas para formação de embriões somáticos.

Portanto, constatata-se que poucos trabalhos foram realizados com crambe, mesmo tendo importância econômica e emprego na agroenergia. Assim, abre-se um vasto campo para

investigações que tenham como objetivo desenvolver as potencialidades dessa cultura e, conseqüentemente, melhorar os aspectos agrônômicos e tecnológicos para seu emprego na indústria de biodiesel.

3.3- O Uso de Marcadores Moleculares em Estudos de Estabilidade Genética Vegetal em Plantas Micropropagadas

A introdução de técnicas moleculares no início da década de 80 propiciou maior segurança, rapidez e eficiência nos estudos de identificação, caracterização e mapeamento genético (BERED; BARBOSA NETO; CARVALHO, 1997). O advento dos marcadores genéticos, definidos como caracteres com mecanismos de herança simples (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), permite avaliar diferenças genéticas entre dois ou mais indivíduos (MILACH, 1998). Esses marcadores podem ser divididos em dois grupos básicos, morfológicos e moleculares.

Os marcadores moleculares, inicialmente marcadores enzimáticos (isoenzimas), e, mais recentemente, marcadores de DNA, oferecem oportunidade de estudo de variabilidade genética existente dentro e entre espécies distintas (SANTOS, 2008). Em comparação com os marcadores morfológicos, citológicos e enzimáticos utilizados para detecção dessas variações, os marcadores de DNA têm a vantagem de serem estáveis, hereditários, altamente reprodutíveis, detectáveis em todos os tecidos, confiáveis, de fácil acesso, rápido uso e independente do ambiente de desenvolvimento (AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008; PATHAK; DHAWAN, 2012).

Marcadores moleculares de DNA têm sido usados para identificação de genes de resistência a doenças, insetos e pragas; avaliação e caracterização de germoplasma; melhoramento dos parentais de híbridos; introgressão gênica e seleção assistida por marcadores; desenvolvimento de mapas genéticos; determinação de grupos heteróticos e associação com regiões genômicas que afetam heterose; reconstituição de pedigrees; testes de pureza genética; associação com caracteres quantitativos; estudos de interação genótipo-ambiente; entre outros (MILACH, 1998; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; ANDERSEN; LUBBERSTEDT, 2003; BORÉM, 2009; ARRIEL et al., 2009). Nos últimos anos, esses marcadores também vêm sendo aplicados com sucesso na avaliação da estabilidade genética de plantas regeneradas por meio das técnicas da cultura de tecidos

vegetais (GOEL; KUKREJA; BISHT, 2009; KISHOR; DEVI, 2009; RAI et al., 2010; SHARMA et al., 2011; SINGH; RAI; SAHOO, 2012; PATHAK; DHAWAN, 2012).

O uso de marcadores moleculares de DNA baseados na técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), tais como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), SSR (*Simple Sequence Repeats*), ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) estão sendo rapidamente integrados como ferramentas de rotina em laboratório de cultura de tecidos vegetais no intuito de realizar uma rápida avaliação da estabilidade genética de plantas micropropagadas (SMYKAL et al., 2007; SHARMA et al., 2011).

A avaliação da constituição e da estabilidade genética *in vitro* de plantas regeneradas torna-se importante para a detecção de sutis variações fenotípicas, citológicas, bioquímicas e/ou moleculares (BORCHETIA et al., 2009), possibilitando, dessa forma, um planejamento estratégico para a propagação de espécies com qualidade e uniformidade desejada antes de serem liberadas para fins comerciais (BHATIA et al., 2009). Contudo, alguns trabalhos demonstraram que a ocorrência de variação genética é algo comum em cultura de células vegetais ou em plantas originadas *in vitro* por meio da regeneração via organogênese e/ou embriogênese somática (CHUANG et al., 2009; MODGIL et al., 2012; ZHAO et al., 2012).

Essa variação genética gerada por meio dos processos de manipulação de células, tecidos ou órgãos vegetais *in vitro* é denominada de variação somaclonal, termo que, embora comumente utilizado na cultura de tecidos vegetais, é considerado impreciso e controverso (VAZQUEZ, 2001). A variação somaclonal é um dos grandes problemas associados à micropropagação comercial (OH et al., 2007) e sua frequência varia de acordo com a espécie, fonte de explante, via de regeneração (embriogênese somática, organogênese ou multiplicação de gemas apicais e laterais), composição do meio de cultura, condições de cultivo e número de subcultivos (BENNICI; ANZIDEI; VENDRAMIN, 2004).

Portanto, a utilização de marcadores moleculares de DNA como estratégia para estudos de estabilidade genética ou detecção de variação somaclonal nos processos de regeneração *in vitro* permite melhor compreensão dos aspectos básicos de desenvolvimento, além de propiciar a otimização de sistemas e protocolos de regeneração de plantas *in vitro* para fins aplicados e biotecnológicos.

3.3.1- Marcadores Moleculares

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA (BERED; BARBOSA NETO; CARVALHO, 1997). Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e Minissatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD, SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), Microssatélite ou SSR, ISSR e AFLP.

A técnica que envolve o marcador do tipo RAPD (WILLIAMS et al., 1990) é amplamente utilizada para a detecção de diversidade genética, porque tem a vantagem de ser tecnicamente simples, de menor custo, menor número de etapas, requer pequenas quantidades de DNA, rapidez na obtenção de resultados, além da aplicabilidade imediata a qualquer tipo de organismo (CEASAR et al., 2010; MILLACH, 2012), sendo uma ferramenta útil para a análise da estabilidade genética de plantas cultivadas *in vitro* (GHEORGHE et al., 2009). O nível de polimorfismo obtido com RAPD varia grandemente com a espécie estudada (MILLACH, 2012). No entanto, tem a desvantagem de proporcionar baixa repetibilidade e consistência entre laboratórios, dificultando a comparação de resultados obtidos em diferentes locais (CARVALHO et al., 2004). A maior parte dessas limitações pode ser minimizada pelo cuidadoso ajuste da reação, manipulação, preparo de reagentes e das condições experimentais (OLMOS et al., 2002; CAIXETA et al., 2009).

Essa técnica baseada em PCR com um único *primer* mais curto (± 10 nucleotídeos) e arbitrário, amplifica um conjunto de segmentos de DNA aleatoriamente distribuídos por todo o genoma, podendo detectar polimorfismos genéticos (CARVALHO et al., 2004; CAIXETA et al., 2009). As bases moleculares do polimorfismo revelado pelo RAPD podem ser mutações de ponto no sítio de pareamento do *primer*, impedindo o seu pareamento e a consequente amplificação do fragmento de DNA (CAIXETA et al., 2009).

Os marcadores RAPD apresentam como característica básica a dominância, ou seja, esse tipo de marcador não permite distinguir indivíduos homozigotos dominantes de heterozigotos em uma população (CAIXETA et al., 2009).

Os Microssatélites ou SSRs envolvem o desenvolvimento de *primers* específicos, que são sequências simples de dois a seis nucleotídeos repetidos em tandem (BUSO et al., 2003; PATHAK; DHAWAN, 2012). Essa técnica inicialmente é elaborada e cara, porém, uma vez que esteja disponível, o custo assemelha-se ao do RAPD, com exceção dos géis para correr os

fragmentos de DNA que devem ser de poliacrilamida ou gel de agarose de alta resolução e de custo mais elevado (MILLACH, 2012).

A maior vantagem dessa técnica é o elevado polimorfismo revelado, o que a torna uma das melhores opções para uso na caracterização de cultivares, especialmente em germoplasma aparentado e de baixa variabilidade (BURG et al., 2007). Esses marcadores estão substituindo rapidamente outros marcadores em vários tipos de estudos genéticos, principalmente, devido à sua reprodutibilidade, simplicidade técnica, à pequena quantidade de DNA requerida e ser codominante (diferencia homozigotos de heterozigotos) (BUSO et al., 2003; CAIXETA et al., 2009), constituindo uma ferramenta extremamente eficiente na identificação e diferenciação de indivíduos.

A grande limitação dos SSRs é a necessidade de serem desenvolvidos especificamente para cada espécie, processo este demorado, trabalhoso e de alto custo, não sendo possível utilizar a estratégia de desenho de “*primers* universais” (BUSO et al., 2003; CAIXETA et al., 2009).

O polimorfismo nos microssatélites, geralmente associados ao tamanho da banda, resulta da ocorrência de diferentes números de unidades repetitivas dentro da estrutura do microssatélite. Essa variação no número de repetições em tandem pode ter sido originada de *crossing-over* desigual ou erro da DNA polimerase durante a replicação, as quais se acumulam mais rapidamente nas populações do que mutações do tipo inserção e deleção, responsáveis pelo polimorfismo de outros marcadores moleculares (CAIXETA et al., 2009).

O ISSR, que é um método baseado em microssatélites, utiliza um único *primer* composto por uma sequência do microssatélite para amplificar principalmente as regiões inter-SSR de diferentes tamanhos, enquanto os SSRs são baseados na amplificação da região repetida usando dois *primers* loco-específicos (BHATIA et al., 2009). Marcadores ISSR não requerem o conhecimento prévio do genoma a ser estudado para o desenho do *primer*, combinando, ainda, a maior parte das vantagens do SSR e AFLP e a universalidade do RAPD (REDDY; SARAL; SIDDIQ, 2002). Esses marcadores são utilizados, sobretudo, para avaliação da diversidade genética, estimativa de parentesco genético e estabelecimento de padrões para a identificação gênica (MARITANO et al., 2010).

Comparado com o RAPD, o ISSR tem maior reprodutibilidade, maior polimorfismo, sendo mais informativo (REDDY; SARAL; SIDDIQ, 2002). Além disso, o comprimento longo dos *primers* de ISSR (15-30 nucleotídeos), contra 10 nucleotídeos dos RAPDs, permite a utilização de elevadas temperaturas de anelamento, o que conduz a uma maior estabilidade no processo de amplificação (PATHAK; DHAWAN, 2012). Entretanto, assim como o RAPD,

os *primers* de ISSR são marcadores dominantes (DEBNATH, 2011). A origem do polimorfismo está na ausência de sequência repetida no genoma ou à presença de uma deleção ou inserção que modifique a distância entre as repetições (GOULÃO; OLIVEIRA, 2001).

O ensaio com ISSR é muito simples, rápido, altamente discriminativo, confiável, com associada eficiência nos custos (custo-benefício), requer pequena quantidade de DNA e não necessita de *primers* específicos (REDDY; SARAL; SIDDIQ, 2002; LAKSHMANAN; VENKATARAMAREDDY; NEELWARNE, 2007). Essas características tornam esse marcador um dos mais apropriados para a detecção de estabilidade clonal de plantas micropropagadas (SREEDHAR; LAKSHMANAN; BHAGYALAKSHMI, 2007).

Por último, a técnica de AFLP possui grande capacidade para detecção de variabilidade genética sendo também utilizada na caracterização de cultivares (MILLACH, 2012), demonstrando diferenças em um conjunto de fragmentos selecionados e digeridos com enzimas de restrição (CAIXETA et al., 2009). As principais características dos marcadores AFLP são a capacidade de analisar, simultaneamente, várias regiões diferentes do genoma e a sua alta reprodutibilidade (MOGANEDI et al., 2007).

Entre as vantagens no uso desses marcadores AFLP estão o alto grau de polimorfismo e o alto número de bandas obtidas por gel analisado (JALIGOT; BEULÉ; RIVAL, 2002; CHUANG et al., 2009). O AFLP necessita de gel de poliacrilamida para maior resolução dos fragmentos, protegida por patente (MILLACH, 2012), requer elevada qualidade e quantidade de DNA (PATHAK; DHAWAN, 2012), utiliza produtos químicos radioativos, equipamentos sofisticados, trabalho intenso, e alto custo associado (CAIXETA et al., 2009). Todos esses fatores citados podem limitar a aplicação dessa técnica na rotina de alguns laboratórios.

O polimorfismo obtido pelos marcadores AFLP é resultado de mutação no sítio de restrição, mutação na sequência adjacente ao sítio de restrição e complementar à região de anelamento do *primer*, além da ocorrência de inserção ou deleção dentro dos fragmentos amplificados (CAIXETA et al., 2009). Segundo esses autores, a grande desvantagem dos marcadores AFLP é a dificuldade de identificar variantes alélicas em um loco específico, o que leva sua utilização, quase que exclusivamente, como marcador dominante.

3.3.2- Estabilidade Genética Vegetal e Variação Somaclonal

A estabilidade genética deve-se à capacidade que as células têm, durante a divisão mitótica, de transmitir a informação genética a partir de uma célula formada, gerando outras duas células com a mesma composição genética, mantendo assim, inalterada a composição e o teor de DNA característico da espécie, garantindo a manutenção da identidade genética ao longo das divisões.

Para os processos de propagação clonal, como a micropropagação, a estabilidade genética é um dos requisitos mais importantes para qualquer espécie em cultivo (RAHMAN; RAJORA, 2001; GHEORGHE et al., 2009). No entanto, Gheorghe et al. (2009) relataram que, quando um tecido vegetal de videira é submetido ao cultivo *in vitro*, as plantas regeneradas podem não se assemelhar a cópias clonais do genótipo doador.

Alguns trabalhos relatam variações genéticas, epigenéticas e fenotípicas ocorrendo durante os processos de regeneração *in vitro* (BENNICI; ANZIDEI; VENDRAMIN, 2004; GOEL; KUKREJA; BISHT, 2009; MIGUEL; MARUM, 2011; ZOGHLAMI et al., 2012; PATHAK; DHAWAN, 2012; ZHAO et al., 2012). Desse modo, as condições de cultivo *in vitro* parecem afetar a estabilidade dos genomas de plantas, pois, várias espécies vegetais e genótipos respondem de forma diferente sob algumas condições (BURG et al., 2007). Ainda segundo esse autor, a instabilidade genética é induzida por estresse *in vitro* e varia entre famílias, ressaltando, que o potencial embriogênico e regenerativo de uma espécie estão correlacionados positivamente com o grau de instabilidade genética.

Essas variações que surgem espontaneamente em cultivos *in vitro* são denominadas de variações somaclonais, tais variações são a soma de variações genéticas (mutações cromossômicas e gênicas) que são incorporadas nas plantas regeneradas de uma espécie (TULMANN NETO; MENDES; ANDO, 1998), podendo ser estáveis e transmissíveis aos descendentes ou apenas de expressão transiente (variações epigenéticas). As razões para que ocorram as variações somaclonais ainda não estão bem esclarecidas, embora fatores como tempo de cultivo (MIÑANO; GONZÁLEZ-BENITO; MARTÍN, 2009), número de subcultivos ou repicagens (HAMAD; TAHA, 2008; BORSE; CHIMOTE; JADHAV, 2011; SHARMA et al., 2011), utilização de fitoreguladores (BAIRU; FENNELL; STADEN, 2006; BISWAS et al., 2009), tipo de explante (CHUANG et al., 2009), passagem pela fase de calo (PEREDO; REVILLA; GARCÍA, 2006), genótipo (KHAN et al., 2009), composição do meio de cultura (LUTTS; KINET; BOUHARMONT, 1998) e o nível de ploidia e mosaicismo (NAKANO et al., 2006) são considerados agentes capazes de induzir variabilidade *in vitro*.

Os mecanismos propostos relacionados à variação somaclonal incluem mutações cromossômicas e pontuais, recombinação somática, trocas entre cromátides irmãs, rearranjos genéticos somáticos, atividade de elementos transponíveis e instabilidade das sequências repetidas em tandem (PHILLIPS; KAEPLER; OLHOFT, 1994; MOHAN, 2001; GHEORGHE et al., 2009), além dos processos epigenéticos, como a metilação do DNA (MIGUEL; MARUM, 2011).

Mudanças na estrutura genética de mitocôndrias e cloroplastos têm sido identificadas, em alguns casos, como provenientes da variação somaclonal (BENNICI; ANZIDEI; VENDRAMIN, 2004). De acordo com Bennici, Anzidei e Vendramin (2004), geralmente a cultura de células vegetais em si gera variabilidade genética por aumentar a frequência de mutações nas células. Alguns autores relatam o surgimento de variação somaclonal indesejável em seus trabalhos (RANI; RAINA, 2000; TRIPATHI; MATHISH; GURUMURTHI, 2006).

Apesar disso, a variação somaclonal também é considerada uma ferramenta valiosa no melhoramento genético de espécies vegetais, em que, tais variações nos tecidos regenerados a partir de células somáticas podem ser utilizadas no desenvolvimento de culturas com novas características de interesse (TULMANN NETO; MENDES; ANDO, 1998). Por meio da aplicação de pressão de seleção no tecido durante o cultivo *in vitro* é possível desenvolver somaclones resistentes a estresses bióticos e abióticos (JAIN, 2001).

3.3.3- Avaliação da Estabilidade Genética Vegetal no Cultivo *in vitro*

Como já relatado, as técnicas moleculares são ferramentas poderosas e valiosas na análise da estabilidade genética de plantas propagadas *in vitro* (DEVARUMATH et al., 2002). Os marcadores moleculares, principalmente os de DNA, têm sido particularmente sugeridos por serem úteis na confirmação da estabilidade genética logo após o processo de propagação, o que é ainda mais vantajoso em espécies com ciclo de vida longo, pois uma avaliação por marcadores morfológicos só poderia ser realizada após a sua fase juvenil e em condições de campo (GHEORGHE et al., 2009).

Dentre os marcadores moleculares de DNA, o RAPD, SSR, ISSR e o AFLP são os mais utilizados para a avaliação da estabilidade genética ou detecção de variação somaclonal. Um levantamento de publicações científicas com esses marcadores (n = 45), indexadas nas bases *SpringerLink*[®] (*MetaPress*) e *ScienceDirect*[®] (*Elsevier*), demonstrou que nos últimos cinco

anos, aproximadamente 47% dos trabalhos utilizaram RAPD para avaliar a estabilidade genética das plantas regeneradas, seguido por aproximadamente 18% dos demais marcadores (SSR, ISSR e AFLP). Os marcadores enzimáticos (isoenzimas) também podem ser utilizados para examinar a estabilidade genética, mas são limitados tanto pelo número quanto pela quantidade de polimorfismo apresentados, e dependem do controle da expressão gênica (BINDIYA; KANWAR, 2003).

Alguns desses marcadores têm sido empregados para analisar a variação genética induzida pelas técnicas de cultura de tecidos vegetais, incluindo espécies frutíferas (Maçã - PATHAK; DHAWAN, 2012; Mirtilo - DEBNATH, 2011; Morango - DEBNATH, 2009; Uva - GHEORGHE et al., 2009; Kiwi - PALOMBI; DAMIANO, 2002), hortaliças (Camélia - BORCHETIA et al., 2009; Funcho - BENNICI; ANZIDEI; VENDRAMIN, 2004; Couve-flor - LEROY et al., 2001), florestais (*Pinus* - BURG et al., 2007; Falsa-acácia - BINDIYA; KANWAR, 2003; Cinamomo - OLMOS et al., 2002; *Populus tremuloides* - RAHMAN; RAJORA, 2001), grãos (Soja - CAMPBELL et al., 2011; Arroz - MEDINA et al., 2004), oleaginosas (Pinhão-manso - SHARMA et al., 2011; SARKAR; ANAND; REDDY, 2010; Patchouli - PAUL et al., 2010; Castanheira - CARVALHO et al., 2004), energéticas (Cana-de-açúcar - GILBERT et al., 2009; LAKSHMANAN, et al., 2006; Eucalipto - TRIPATHI; MATHISH; GURUMURTHI, 2006), dentre outras (Eclipta - SINGH; RAI; SAHOO, 2012; Crisântemo - MINÃÑO; GONZÁLEZ-BENITO; MARTÍN, 2009; Gérbera - BHATIA et al., 2009).

Os marcadores do tipo RAPD têm sido amplamente utilizados para a detecção de variabilidade genética de plantas regeneradas *in vitro* (GOEL; KUKREJA; BISHT, 2009; KISHOR; DEVI, 2009; SHARMA et al., 2011; SINGH; RAI; SAHOO, 2012), sobretudo pelo fato da facilidade de sua execução, ser de baixo custo e requerer baixa quantidade de DNA para análise (CEASAR et al., 2010; ASTHANA; JAISWAL; JAISWAL, 2011).

Enquanto os marcadores RAPD são largamente utilizados para analisar a variação genética gerada pelas técnicas *in vitro*, os SSR, por serem marcadores moleculares relativamente recentes e usados principalmente em estudos de genética humana e animal, sua aplicação na área vegetal está relacionada aos trabalhos de avaliação de similaridade genética (ou dissimilaridade) (PALOMBI; DAMIANO, 2002), embora existam relatos do seu uso para avaliar fidelidade genética de material micropropagado. Um estudo comparativo de Palombi e Damiano (2002), entre RAPD e SSR, na detecção de variações genéticas entre plantas micropropagadas de kiwi (*Actinidia deliciosa* A. Chev - Actinidiaceae), mostrou que apenas

os marcadores SSR foram capazes de detectar polimorfismos no tecido das plântulas regeneradas.

Em pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L. – Euphorbiaceae), a análise por meio de RAPD de plantas provenientes de segmento nodais utilizados como explante confirmou uma similaridade genética entre os clones e suas respectivas plantas-mãe (LEELA et al., 2011).

Borchetia et al. (2009), avaliando a estabilidade genética de plantas regeneradas a partir de cotilédones, compararam a eficiência dos marcadores RAPD, ISSR e SSR em camélia (*Camellia sinensis* L. – Theaceae). Os autores relataram que os SSR demonstraram estabilidade genética completa entre os regenerados, ou seja, 100% de similaridade. Algumas plantas apresentaram variações com os *primers* de RAPD e ISSR, contudo estes mostraram semelhanças acima de 80% com a planta doadora de explante, o que segundo os autores não foi uma diferença significativa.

O uso de marcadores ISSR para avaliação da estabilidade genética também já está bem documentado (LEROY et al, 2001; JOSHI; DHAWAN, 2007; LAKSHMANAN; VENKATARAMAREDDY; NEELWARNE, 2007; BHATIA et al., 2009). Segundo Leroy et al. (2001), esses marcadores são considerados adequados para detectar variações derivadas da cultura de tecidos em plantas da família Brassicaceae, tais como, couve-flor (*Brassica oleracea*), colza (*Brassica napus*), rabanete (*Raphanus sativus*), crambe (*Crambe abyssinica*), dentre outras.

Embora os marcadores ISSR e RAPD demonstrem capacidade apurada em identificar estabilidade genética em algumas plantas micropropagadas (SREEDHAR; LAKSHMANAN; BHAGYALAKSHMI, 2007; ALIZADEH; SINGH, 2009), alguns estudos revelam que o ISSR produz maior número de bandas polimórficas do que o RAPD (PATHAK; DHAWAN, 2012), revelando assim maior sensibilidade para distinguir genótipos.

Pathak e Dhawan (2012) demonstraram que marcadores ISSR, comparado com RAPD, tem maior número de fragmentos polimórficos por *primer* devido à abundância de regiões de SSR em plantas de maçã (*Malus domestica* Borkh var. rootstock Merton 793 – Rosaceae) regeneradas a partir de gemas axilares. Em um estudo similar, Devarumath et al. (2002) revelaram que, em plantas de camélia micropropagadas por segmentos nodais, os ISSR detectaram mais loci polimórficos (12,8%) do que marcadores RAPD (4,28%).

Sharma et al. (2011), em seu trabalho com plantas regeneradas de pinhão-mansão por meio de gemas axilares, investigaram a estabilidade genética utilizando RAPD e AFLP, e concluíram que ambos marcadores são eficientes na discriminação de genótipos dessa

espécie, sugerindo ainda que esses explantes são adequados para a regeneração de clones com alta estabilidade genética.

Portanto, é notório que os clones de uma espécie possam, às vezes, mostrar uniformidade genética com um determinado marcador molecular e variação com outro. Sob tais circunstâncias, o indicado é que seja feito um *fingerprint* do DNA dessas espécies, o que identificaria com precisão as diferenças genéticas entre as plantas estudadas.

Com relação às principais vias de regeneração utilizadas normalmente em estudos *in vitro*, Leroy et al. (2001), usando ISSR em couve-flor (*Brassica oleracea* var. botrytis - Brassicaceae), não encontraram polimorfismo entre os diferentes regenerantes originados a partir de embriões somáticos derivados de hipocótilo. No entanto, esses mesmos autores observaram que em 224 calos de couve-flor, apenas seis apresentaram estabilidade genética.

Resultados semelhantes foram detectados por Sánchez et al. (2003), em seu estudo com carvalho (*Quercus robur* - Fabaceae), em que não observaram nenhuma alteração genética, utilizando marcadores RAPD em plântulas regeneradas por embriogênese somática a partir de folhas e segmentos nodais. Já em tamareira (*Phoenix dactylifera* L. cv. Zaghloul - Arecaceae), plantas regeneradas a partir de embriões somáticos obtidos de calos embriogênicos de ápices caulinares exibiram variação somaclonal utilizando essa mesma técnica (SAKER et al., 2000).

Brotos regenerados a partir de calos em amendoim [*Arachis pintoi* (Krap. and Greg.) - Fabaceae] demonstraram ser similares às plantas-mãe pela técnica de RAPD; portanto, nenhuma variação somaclonal foi evidente com o uso deste método (CARVALHO; QUESENBERRY; GALLO, 2010).

Heinze e Schmidt (1994) sugeriram que a proliferação de calos envolve provavelmente menor atividade gênica do que a formação de embriões somáticos ou regeneração de plantas. Como resultado, plantas regeneradas por via direta são provavelmente mais geneticamente estáveis do que aquelas regeneradas por via indireta (SÁNCHEZ et al., 2003).

Resultados semelhantes foram relatados por Debnath (2011), em que plantas micropropagadas de mirtilo (*Vaccinium angustifolium* Ait. - Ericaceae) obtidas por meio de organogênese direta de brotos a partir de explantes foliares, mostraram-se geneticamente estáveis. Embora seja relatada maior variação genética relacionada predominantemente com a regeneração de plantas a partir de estruturas desorganizadas como os calos (PIOLA; ROHR; HEIZMANN, 1999), essas variações também têm sido relatadas em plântulas derivadas via organogênese direta, como por exemplo, por meio de gemas axilares (SONEJI; RAO; MHATRE, 2002).

Considerando a importância de assegurar a estabilidade genética de plantas regeneradas *in vitro* em programas de conservação e micropropagação, é importante escolher uma via de regeneração que não permita ou dificulte a indução dessas variações indesejáveis. Com os resultados aqui apresentados, fica claro que a indução de células a partir da proliferação de estruturas organizadas como ápices caulinares ou gemas axilares é a forma mais confiável para se manter a estabilidade genética no material propagado *in vitro*. Assim, as vias de regeneração direta por organogênese ou embriogênese somática representam a abordagem mais indicada em relação à fase indireta de calo, pois essa última pode vir a induzir variações significativas.

Alguns fatores no cultivo *in vitro* podem influenciar na manutenção da estabilidade genética, como a formulação salina do meio, tipo e concentração do regulador de crescimento, o tipo e idade do explante, os números de subcultivos, o tempo de cultivo, dentre outros (BENNICI; ANZIDEI; VENDRAMIN, 2004).

Em função disso, alguns trabalhos investigam a influência de tipo e concentração do regulador de crescimento, assim como o tipo e idade dos explantes sobre o aparecimento de possíveis variações somaclonais nos materiais regenerados *in vitro*.

Plantas micropropagadas a partir de estruturas pré-formadas, tais como ápices caulinares (KISHOR; DEVI, 2009) e gemas axilares (DEBNATH, 2011) foram relatadas mantendo a estabilidade clonal. Contudo, ainda existem possibilidades de gerar variantes somaclonais utilizando esses explantes (RANI; RAINA, 2000).

Os resultados de análise de estabilidade genética apresentados por Borchetia et al. (2009) confirmaram o fato de que a micropropagação a partir das gemas axilares é o modo mais seguro de se evitar o aparecimento de variações indesejadas e produzir clones geneticamente verdadeiros. Existem relatos na literatura que citam resultados semelhantes (CARVALHO et al., 2004; MARTINS; SARMENTO; OLIVEIRA, 2004).

A utilização de marcadores ISSR para avaliar a estabilidade genética de plântulas de *Swertia chirayita* (Gentianaceae) propagadas *in vitro* por meio da multiplicação gemas axilares confirmou a estabilidade clonal do material regenerado e corroborou com o fato de que a multiplicação desses explantes é o modo mais seguro para a multiplicação de plantas (JOSHI; DHAWAN, 2007).

Bhatia et al. (2009) concluíram que a fonte de explantes e a via de regeneração adotada têm efeito significativo sobre a estabilidade genética de plantas micropropagadas de gérbera (*Gerbera jamesonii* Bolus - Asteraceae). Os autores relataram que inflorescências e ápices caulinares de gérbera podem ser explorados com segurança como explantes para a

multiplicação massal de plantas genótipo-verdadeiras, enquanto as folhas devem ser evitadas como explante, pois mostraram algum grau de variações somaclonais.

Na cultura da maçã existem poucos relatos sobre a avaliação da fidelidade genética de plantas regeneradas, e a maioria são baseados em análise com marcadores RAPD. Caboni et al. (2000) relataram a ocorrência de variações somaclonais em plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh - Rosaceae) regenerada por meio de organogênese de folhas e avaliadas por RAPD. No entanto, plantas regeneradas a partir do meristema apical demonstraram alta estabilidade genética.

A variação somaclonal também foi observada em plantas de couve-flor (*Brassica oleracea* var. botrytis - Brassicaceae) propagadas a partir de meristemas de raízes adventícias e na cultura de anteras derivadas de duplo-haploides de colza (*Brassica napus* - Brassicaceae) regeneradas a partir de calos cotiledonares (CARDOZA; STEWART JUNIOR, 2004).

Eeuwens et al. (2002) avaliaram o efeito da auxina 2,4-D em dendê (*Elaeis guineensis* Jacq - Arecaceae). Explantes radiculares e foliares tratados com altos níveis de 2,4-D regeneram plantas que apresentaram variação somaclonal. Alguns estudos suportam a ideia de que o fenótipo anormal de plantas regeneradas é, provavelmente, o resultado da sensibilidade e/ou resposta aos reguladores de crescimento na cultura *in vitro* (JALIGOT et al., 2011). Por isso, tem sido proposto que a ação dos reguladores de crescimento seja mediada por meio de modificações epigenéticas (KROGAN; LONG, 2009).

A cultura de tecidos é reconhecida como uma das principais áreas da biotecnologia, principalmente por seu uso potencial para a multiplicação clonal rápida e conservação de espécies vegetais importantes. No entanto, para o uso contínuo de suas ferramentas como fornecedora de material vegetal para fins comerciais, o monitoramento periódico do grau de estabilidade genética de plantas propagadas *in vitro* é de extrema importância.

O uso de técnicas de PCR com marcadores moleculares tais como RAPD, SSR, ISSR e AFLP são imprescindíveis para detecção de variações genéticas em culturas *in vitro*, denominadas comumente de variações somaclonais. Tais técnicas devem ser utilizadas com rigor, devendo inicialmente reconhecer o indivíduo e o explante utilizado.

Novos estudos são necessários para entender como e onde no genoma das plantas cultivadas *in vitro* ocorrem as variações genéticas. A partir desse conhecimento, é possível desenvolver marcadores moleculares mais adequados para detectar a variabilidade genética de plantas micropropagadas.

3.4- Anatomia Vegetal de Plântulas *in vitro*

A Anatomia Vegetal é o ramo da Botânica que estuda a estrutura interna dos organismos vegetais, permitindo a descrição de células, tecidos e órgãos quanto a sua ontogênese, constituição e função (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2003). A anatomia pode auxiliar na compreensão de vários fenômenos relacionados ao corpo vegetal, dentre os quais, as respostas ao cultivo *in vitro*. Sendo exposta a essa nova condição artificial, as células vegetais podem expressar um potencial morfogênico que não se expressaria *in vivo* (RODRIGUES; OLIVEIRA; MARIATH, 2004).

A propagação *in vitro* tem sido extensivamente utilizada para a rápida multiplicação de muitas espécies vegetais (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Mas o sucesso final da propagação, no âmbito comercial, depende da capacidade de transferir as plantas para o ambiente *ex vitro* em larga escala, com baixo custo e altas taxas de sobrevivência (HAZARIKA, 2006).

Para isso, a anatomia vegetal tem sido utilizada como ferramenta de valiosa importância no sucesso das técnicas de micropropagação (SILVA; ALQUINI; CAVALLET, 2005). Diversos estudos têm caracterizado histologicamente os processos de morfogênese *in vitro* (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; VIEIRA; DORNELAS, 1999; RODRIGUES; OLIVEIRA; MARIATH, 2004; DOUSSEAU et al., 2008; FERMINO JUNIOR; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2009; CHIRINÉA et al., 2012), e segundo Lombardi et al. (2007), para o completo uso da ferramenta de micropropagação, faz-se necessária a compreensão dos aspectos histológicos e morfológicos.

3.4.1- Alterações Anatômicas *in vitro*

Plantas cultivadas *in vitro*, frequentemente, exibem peculiaridades no seu desenvolvimento anatômico, morfológico e fisiológico (MAJADA et al., 1998; CALVETE et al., 2002; FERMINO JUNIOR; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2009). Estas podem desenvolver determinadas características que são incompatíveis com o seu estabelecimento em campo, isso devido às condições de cultivo *in vitro*, com ambiente hermeticamente fechado, entrada de CO₂ limitada, baixo nível de luz, em condições assépticas, em meio contendo açúcar (sacarose), nutrientes e grandes doses de reguladores de crescimento, para permitir o

crescimento heterotrófico, e em ambiente com alta umidade relativa do ar (POSPÍŠILOVÁ et al., 1999; LEE et al., 2000; HAZARIKA, 2006).

No que se refere à anatomia, as plantas *in vitro* são, geralmente, diferentes daquelas crescidas em casa de vegetação ou em campo (*in vivo*) (ALBARELLO et al., 2001; LOURO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2008), além disso, também podem ocorrer alterações adaptativas da transferência do ambiente *in vitro* para *ex vitro*, ou seja, durante a aclimatização (ZOBAYED; ARMSTRONG; ARMSTRONG, 2001; ROMANO; MARTINS-LOUCAO, 2003; APÓSTOLO; BRUTTI; LLORENTE, 2005; MAYER et al., 2008).

Em geral, o aspecto das plântulas cultivadas *in vitro* apresenta-se pouco lignificado, com células de paredes pouco espessadas, abundância de espaços intercelulares, sistema vascular pouco desenvolvido e reduzida quantidade de tecidos de sustentação (DONNELLY; VIDAVER; LEE, 1985). A estrutura do mesofilo pode mudar de modo que o parênquima paliçádico seja menor e haja mais espaços intercelulares (JOHANSSON; KRONESTEDT-ROBARDS; ROBARDS, 1992). Alterações anatômicas mais comuns incluem quantidades reduzidas ou inexistência de cera epicuticular (ZOBAYED; ARMSTRONG; ARMSTRONG, 2001), estômatos mal formados ou funcionando inadequadamente (APÓSTOLO; BRUTTI; LLORENTE, 2005), baixa capacidade fotossintética (LEE et al., 2000), conexão vascular entre caule e raízes adventícias precária para atender à demanda evapotranspiratória (BRAGA et al., 2011), além de outras anormalidades anatômicas.

As investigações na anatomia de órgãos *in vitro* são feitas normalmente em folhas (ZOBAYED; ARMSTRONG; ARMSTRONG, 2001; ALBARELLO et al., 2001), pois, são os locais de maior síntese, para verificar possíveis modificações internas como consequência do desenvolvimento no ambiente de cultura *in vitro*.

Diversas alterações na estrutura da folha de plantas mantidas *in vitro* têm sido reportadas, como estômatos com aumento no tamanho, formato diferente, densidade e distribuição não uniforme, redução no controle de abertura e fechamento, e podem se apresentar levemente projetados e abertos (OSÓRIO et al., 2005; DOUSSEAU et al., 2008; BRAGA et al., 2011), na quantidade de cera epicuticular, na espessura e diferenciação do mesofilo, com alta proporção de espaços intercelulares (KHAN et al., 2003; RESENDE; CASTRO; PEREIRA, 2008) e número de cloroplasto alterado (POSPÍŠILOVÁ et al., 1999).

O motivo dessas alterações está associado com o ambiente gasoso *in vitro* com elevada umidade, grande flutuação na concentração de CO₂ e a acumulação de etileno ou outra substância tóxica (ZOBAYED; ARMSTRONG; ARMSTRONG, 2001; HAZARIKA, 2006; FERMINO JUNIOR; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2009), que são principalmente devido à

restrita troca de gases entre o ambiente *in vitro* e o ambiente externo. Além disso, as modificações na qualidade da luz também são reportadas com um fator indutor dessas alterações (HALIAPAS et al., 2008; MACEDO et al., 2011).

3.4.2- Problemas Causados pelas Alterações Anatômicas *in vitro*

O principal problema relacionado às alterações anatômicas das plantas cultivadas *in vitro* é inviabilizar a aclimatização, durante a transferência e estabelecimento do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* (casa de vegetação ou campo) (POSPÍŠILOVÁ et al., 1999; ALBARELLO et al., 2001; BRAGA et al., 2011).

Uma elevada porcentagem de mudas regeneradas *in vitro* é geralmente perdida ou danificada durante o período de aclimatização, o que limita a aplicação das técnicas de micropropagação (ZOBAYED; ARMSTRONG; ARMSTRONG, 2001). Diversos estudos histológicos demonstraram que os órgãos vegetativos de plantas desenvolvidas *in vitro* apresentam tecidos e estruturas pouco diferenciadas se comparadas com plantas cultivadas em campo ou casa de vegetação (LOURO et al., 2003; APÓSTOLO; BRUTTI; LLORENTE, 2005).

O modo heterotrófico de nutrição e a falta de mecanismos de controle de perda de água dessas plantas as tornam vulneráveis ao choque no transplante para a condição *ex vitro* (LAMHANEDI; CHAMBERLAND; TREMBLAY, 2003). Quando transferidas para essas condições, as mudas geralmente apresentam altas taxas de transpiração (BANDEIRA et al., 2007), o que na maioria das situações, provoca um elevado déficit hídrico, podendo causar a morte das mudas (DÍAZ-PEREZ, SUTTER; SHACKEL, 1995).

3.4.3- Anatomia *in vitro* de *Crambe abyssinica*

Não são encontrados relatos na literatura especializada sobre a anatomia de *C. abyssinica*, existindo apenas descrições generalizadas para a família Brassicaceae em Rao e Inamdar (1983), além de trabalhos relacionados ao cultivo *in vitro* para algumas espécies da família, como, *Brassica napus* L. (colza), *B. gravinae* Ten., *B. rapa* L. (nabo), *Raphanus sativus* L. (rabanete), *Diplotaxis tenuifolia* (UENO, 2011) e *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (BOEGER; POULSON, 2006).

Torna-se importante caracterizar anatomicamente uma planta tanto em condições *in vivo*, *in vitro*, como durante o processo de aclimatização (*ex vitro*), bem como, escolher adequadamente o órgão para tal estudo, para atestar processos de micropropagação efetivos que não causem alterações que venham comprometer o desenvolvimento da cultura no campo.

4- REFERÊNCIAS

- ABDOLI, M.; MOIENI, A.; DEHGHANI, H. Effects of cultivar and agar concentration on *in vitro* shoot organogenesis and hyperhydricity in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Pakistan Journal of Botany**, v. 39, n. 1, p. 31-35, 2007.
- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 617-631, 2008.
- AIR. **Crambe abyssinica, a comprehensive program** – Workshop – Part 4 – Utilization. Summary information. AIR-CT 94-2480, 1997 Disponível em: <<http://www.biomatnet.org/secure/Air/F709.htm>>. Acesso em: 30 de abril de 2012.
- AIRES, P. S. R.; CARVALHO, J. M. F. C.; PIMENTEL, N. W.; SILVA, H. Efeito da citocinina 6-bencilaminopurina na micropropagação *in vitro* da mamona utilizando o genótipo BRS nordestina. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 8, n. 2, p. 80-85, 2008.
- ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S.F.L.; VIANA, V.R.C.; NEVES, L.J. Anatomia foliar de *Rollinia mucosa* Jacq. Baill. (Annonaceae) sob condições de cultivo *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, p. 35-46, 2001.
- ALIZADEH, M.; SINGH, S. K. Molecular assessment of clonal fidelity in micropropagated grape (*Vitis* spp.) rootstock genotypes using RAPD and ISSR markers. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 37-44, 2009.
- ALMEIDA, S. S.; ROCHA FILHO, G. N.; ZOGHBI, M. das G. B. O potencial da flora oleífera na Amazônia. In: PESCE, C. (ed.). **Oleaginosas da Amazônia**. 2.ed., Revista Atual. Belém: Museu Paraense Emilio Goeldi; Núcleo de Estudos Agrários e Desenvolvimento Rural, 2009. p. 23-30.
- ALTMAN, A. Plant biotechnology in the 21 st century: the challenges ahead. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 51-55, 1999.
- ANDERSEN, J. R.; LUBBERSTEDT, T. Functional markers in plants. **Trends in Plant Science**, v. 8, n. 11, 2003.
- ANDERSON, J. K.; WARWICK, S. I. Chromosome number evolution in the tribe Brassiceae (Brassicaceae): evidence from isozyme number. **Plant Systematics and Evolution**, v. 215, p. 255-285, 1999.
- APÓSTOLO, N.M.; BRUTTI, C.B.; LLORENTE, B.E. Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 41, p. 307–313, 2005.
- APPEZZATO DA GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa: Editora UFV. 2003, 438p.

- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; VIEIRA, M.L.C.; DORNELAS, M.C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 11, p. 2007-2013, 1999.
- ARIEL, N. H. de C; COSTA, M. M.; TREVISOLI, S. H. U.; MAURO, A. O. D. Outras aplicações dos marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (ed.). **Marcadores Moleculares**. 2ª ed. Viçosa: UFV, 2009. p. 209-274.
- ARTUS, N. N. Arsenic and cadmium phytoextraction potential of crambe compared with Indian mustard. **Journal of Plant Nutrition**, v. 29, p. 667-679, 2006.
- ASTHANA, P.; JAISWAL, V. S.; JAISWAL, U. Micropropagation of *Sapindus trifoliatus* L. and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD analysis. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, p. 1821-1829, 2011.
- BAIRU, M. W.; FENNELL, C. W.; STADEN, J. V. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in *Cavendish banana* (Musa AAA cv. 'Zelig'). **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 4, p. 347-351, 2006.
- BANDEIRA, F.S; XAVIER, A.; OTONI, W.C.; LANI, E.R.G. Aclimatização *ex vitro* de plantas propagadas pela enxertia *in vitro* de clones de *Eucalyptus urophylla* X *E. grandis*. **Revista Árvore**, v. 35, n. 1, p. 773-781, 2007.
- BELTRÃO, N. E. de M.; VALE, L. S. do; COSTA, S. G. da. **Bioenergia, Mamona e o Biodiesel no Brasil e no Mundo: Atualidades e Perspectivas**. Campina Grande, PB: 2006. 18 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 158).
- BENNICI, A.; ANZIDEI, M.; VENDRAMIN, G. G. Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. Regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. **Plant Science**, v. 166, p. 221-227, 2004.
- BERED, F.; BARBOSA NETO, J. F.; CARVALHO, F. I. F. de. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, v. 27, n. 3, p. 513-520, 1997.
- BHATIA, R.; SINGH, K. P.; JHANG, T.; SHARMA, T. R. Assessment of clonal fidelity of micropropagated gerbera plants by ISSR markers. **Scientia Horticulturae**, v. 119, p. 208-211, 2009.
- BINDIYA, K.; KANWAR, K. Random amplified polymorphic DNA (RAPDs) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Robinia pseudoacacia* L. **Euphytica**, v. 132, p. 41-47, 2003.
- BISPO, A. S.; DELFINO, L. D.; COSTA, B. J.; SUCHEK, E. M.; ADÃO, D. C.; FONSECA, F. C.; ZAGONEL, G. F.; ADAD, L. B.; MAIA, M.; SILVA, P. R.; VECHIATTO, W. W. D. Caracterização de óleos vegetais extraídos mecanicamente sob condições variadas, visando à produção de biodiesel. In: 4º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel; 7º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 2010, Belo Horizonte, MG. **Anais...** Belo Horizonte, MG: TECPAR, 2010.

- BISWAS, M. K.; DUTT, M.; ROY, U. K.; ISLAMB, R.; HOSSAIN, M. Development and evaluation of *in vitro* somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits. **Scientia Horticulturae**, v. 122, n. 3, p. 409-416, 2009.
- BOEGER, M.R.T.; POULSON, M.E. Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a morfologia foliar de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 2, p. 329-338, 2006.
- BORCHETIA, S.; DAS, S. C.; HANDIQUE, P. J.; DAS, S. High multiplication frequency and genetic stability for commercialization of the three varieties of micropropagated tea plants (*Camellia* spp.). **Scientia Horticulturae**, v. 120, p. 544-550, 2009.
- BORÉM, A. Aplicação dos marcadores moleculares no melhoramento. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (ed.). **Marcadores Moleculares**. 2ª ed. Viçosa: UFV, 2009. p. 95-102.
- BORSE, N.; CHIMOTE, V. P.; JADHAV, A. S. Stability of micropropagated *Musa acuminata* cv. Grand Naine over clonal generations: A molecular assessment. **Scientia Horticulturae**, v. 129, n. 3, p. 390-395, 2011.
- BOUKOUVALAS, S.; CHOULIARAS, V.; ISARI, A.; TZIANOUMIS, K. Prospects for Biological Fuels Production from Plant Oil. **AgroThesis**, v. 5, n. 1, p. 26-30, 2007.
- BRAGA, F.T.; PASQUAL, M.; CASTRO, E.M.de; RAFAEL, G.C.; FAVERO, A.C.; VALENTE, T.C.T. Alterações morfofisiológicas de plantas de abacaxizeiro influenciadas por diferentes substratos durante o processo de aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 5, 2011.
- BRASIL, **Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Produção e Agroenergia. 2. ed. rev.- Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica, 2006.
- BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis**, n. 20, 2009. Disponível em:
<http://www.mme.gov.br/spg/galerias/arquivos/publicacoes/boletim_mensal_combustiveis_renovaveis/Boletim_DCR_nx_020_-_agosto_de_2009.pdf>. Acesso em: 02 Maio 2011.
- BURG, K.; HELMERSSON, A.; BOZHKOVA, P.; ARNOLD, S. V. Developmental and genetic variation in nuclear microsatellite stability during somatic embryogenesis in pine. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 3, p. 687-698, 2007.
- BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZOHN, M. de C.; AMARAL, Z. P. de Z.; BRONDANI, R. V. Marcadores microssatélites em espécies vegetais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, 2003.
- CABONI, E.; LAURI, P.; DAMIANO, C.; D'ANGELI, S. Somaclonal variation induced by adventitious shoot regeneration in pear and apple. **Acta Horticulturae**, v. 530, p. 195-202, 2000.

- CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B. de; BRITO, G. G. de; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (ed.). **Marcadores Moleculares**. 2ª ed. Viçosa: UFV, 2009. p. 11-94.
- CALVETE, E.O.; AZEVEDO, M.; BORDIGNON, M.H.; SUZIN, M. Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 649-653, 2002.
- CAMPBELL, B. C.; LEMARE, S.; PIPERIDIS, G.; GODWIN, I. D. IRAP, a retrotransposon - based marker system for the detection of somaclonal variation in barley. **Molecular Breeding**, v. 27, p. 193-206, 2011.
- CARDOSO, J. de N. O. **Conversão *in vitro* de embriões zigóticos de híbridos de dendezeiro (*Elais guineensis* x *E. oleifera*) em plântulas**. Amazônia: UFRA, 52 p., 2010. Dissertação (mestrado).
- CARDOZA, V.; STEWART JUNIOR, C. N. Brassica biotechnology: progress in cellular and molecular biology. **In Vitro Cellular Development Biology-Plant**, v. 40, p. 542-551, 2004.
- CARLSON, K.D.; GARDNER, J.C.; ANDERSON, V.L.; HANZEL, J.J. Crambe: new crop success. In: JANICK, J. (ed.). **Progress in new crops**. Alexandria: ASHS Press, p. 306-322, 1996.
- CARVALHO, J. M. F. C.; RIBEIRO, C. S. N.; SILVA, H. S.; SANTOS, J. W. **Propagação *In Vitro* e Aclimação a partir de Sementes Inviáveis Armazenadas no Banco Ativo de Germoplasma de Mamona**. Campina Grande, PB: 2005. 23 p. (Embrapa Algodão. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 194).
- CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. de A.; MEDEIROS, M. J. L. e. **Fatores Inerentes à Micropropagação**. Campina Grande, PB: 2006. 28 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 148).
- CARVALHO, L. C.; GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C.; GONÇALVES, J. C.; AMÂNCIO, S. RAPD assessment for identification of clonal identity and genetic stability of *in vitro* propagated chestnut hybrids. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 77, p. 23-27, 2004.
- CARVALHO, M. A.; QUESENBERRY, K. H.; GALLO, M. Comparative assessment of variation in the USA *Arachis pintoi* (Krap. and Greg.) germplasm collection using RAPD profiling and tissue culture regeneration ability. **Plant Systematics and Evolution**, v. 288, p. 245-251, 2010.
- CASTLEMAN, G.; PYMER, S.; GREENWOOD, C. Potential for Crambe (*C. abyssinica*) in Mallee/Wimmera of Australia. In: **Proceedings 10th international rapessed congress**. Canberra, Australia; 1999.
- CEASAR, S. A.; MAXWELL, S. L.; PRASAD, K. B.; KARTHIGAN, M.; IGNACIMUTHU, S. Highly efficient shoot regeneration of *Bacopa monnieri* L. using a two-stage culture procedure and assessment of genetic integrity of micropropagated plants by RAPD. **Acta Physiology Plant**, v. 32, p. 443-452, 2010.

- CHHIKARA, S.; DUTTA, I.; PAULOSE, B.; JAIWAL, P. K.; DHANKHER, O. P. Development of an *Agrobacterium*-mediated stable transformation method for industrial oilseed crop *Crambe abyssinica* 'BelAnn'. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 457-465, 2012.
- CHIRINÉA, C.F.; PASQUAL, M.; ARAUJO, A.G.de; PEREIRA, A.R.; CASTRO, E.M.de. Acclimatization and leaf anatomy of micropropagated fig plantlets. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 4, p. 1180-1188, 2012.
- CHUANG, S. J.; CHEN, C. L.; CHEN, J. J.; CHOU, W. Y.; SUNG, J. M. Detection of somaclonal variation in micro-propagated *Echinacea purpurea* using AFLP marker. **Scientia Horticulturae**, v. 120, p. 121-126, 2009.
- COLODETTI, T.V.; MARTINS, L.D.; RODRIGUES, W.N.; BRINATE, S.V.B.; TOMAZ, M.A. Crambe: aspectos gerais da produção agrícola. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 14, p. 258-269, 2012.
- CRIBB, A.Y. Sistema agroalimentar brasileiro e biotecnologia moderna: oportunidade e perspectiva. **Caderno de Ciência e Tecnologia**, v. 21, n. 1, p. 169-195, 2004.
- DAHLKE, C.F.; SIMONETTI, A.P.M.M. Interferência de diferentes temperaturas na germinação do crambe. **Cultivando o Saber**, Cascavel, v. 3, n. 4, p. 167-174, 2010.
- DEBNATH, S. C. Adventitious shoot regeneration in a bioreactor system and EST-PCR based clonal fidelity in lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.). **Scientia Horticulturae**, v. 128, p. 124-130, 2011.
- DEBNATH, S. C. Characteristics of strawberry plants propagated by in vitro bioreactor culture and *ex vitro* propagation method. **Engineer Life Science**, v. 9, p. 239-246, 2009.
- DESAI, B.B. Seeds handbook: biology, production processing and storage. 2. ed. New York: **Marcel Dekker**, 2004. 787 p.
- DESAI, B.B.; KOTTECHA, P.M.; SALUNKHE, D.K. Seeds handbook: biology, production processing and storage. **Marcel Dekker**, New York, 627 p., 1997.
- DEVARUMATH, R. M.; NANDY, S.; RANI, V.; MARIMUTHU, S.; MURALEEDHARAN, N.; RAINA, S.N. RAPD, ISSR and RFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic integrity of micropropagated plants of three diploid and triploid elite tea clones representing *Camellia sinensis* (China type) and *C. assamica* ssp. *Assamica* (Assam-Indian type). **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 166-173, 2002.
- DÍAZ-PEREZ, J.C.; SUTTER, E.G.; SHACKEL, K.A. Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. **Physiologia Plantarum**, v. 95, n. 2, p. 225-232, 1995.
- DONNELLY, D.J.; VIDAVER, W.E.; LEE, K.Y. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 4, p. 43-50, 1985.

DOUSSEAU, S.; ALVARENGA, A.A.de; CASTRO, E.M.de; SOARES, R.P.; EMRICHV, E.B; MELO, L.A.de. Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl.) NIch. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante a aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1694- 1700, 2008.

DRAGANA, V.; DRAGAN, S.; GILBERT, A.; VLADIMIR, M. Micropropagation of *Helianthus maximiliani* (Schrader) by shoot apex culture. **Helia**, v. 24, n. 34, p. 63-68, 2001.
ECHEVENGUÁ, A. **Crambe surge como nova opção para produzir biodiesel**. 2007. Disponível em: <www.ecoeacao.com.br>. Acesso em: 9 maio 2013.

EEUWENS, C. J.; LORD, S.; DONOUGH, C. R.; RAO, V.; VALLEJO, G.; NELSON, S. Effects of tissue culture conditions during embryoid multiplication on the incidence of “mantled” flowering in clonally propagated oil palm. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 70, p. 311-323, 2002.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção da soja: rotação de culturas**. Londrina, 2004. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosojaPR/rotacao.htm>>. Acesso em: 15 out. 2010.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.

FALASCA, S.L.; FLORES, N.; LAMAS, M.C.; CARBALLO, S.M.; ANSCHAU, A. *Crambe abyssinica*: an almost unknown crop with a promissory future to produce biodiesel in Argentina. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 5808-5812, 2010.

FAUGUEL, C. M.; VEGA, T. A.; NESTARES, G.; ZORZOLI, R.; PICARDI, L. A. Anatomy of normal and hyperhydric sunflower shoots regenerated *in vitro*. **Helia**, v. 31, n. 48, p. 17-26, 2008.

FAVARO, S.P.; ROSCOE, R.; DELMONTES, A.M.A.; MENDONÇA, B.P.C.; SOUZA, A.D.V.de. Produtos e co-produtos. Tecnologia e produção: crambe 2010. Maracajú: **FUNDAÇÃO MS**, v. 1, p. 48-51, 2010.

FERMINO JUNIOR, P.C.P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Características anatômicas de folhas de Teca (*Tectona grandis* L.) desenvolvidas sob condições de cultivo *in vitro* e *ex vitro*. **Evidência**, v. 9, n. 1-2, p. 17-28, 2009.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN (Documento 20), 1998. p. 16-17.

FILA, G.; FONTANA, F.; MAESTRINI, C.; BELLOCCHI, G. Field evaluation of crambe cultivars in northern Italy. In: **Proceedings VII ESA Congress**, Cordoba, Spain; 2002.

FONTANELI, R.S.; SANTOS, H.P.; VOSS, M.; AMBROSI, I. Rendimento e nodulação de soja em diferentes rotações de espécies anuais de inverno sob plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 349-355, 2000.

FUNDAÇÃO MS. **Crambe (Crambe abyssinica)** – cultivar FMS Brillhante: uma boa alternativa para produção de biodiesel. Boletim informativo, 2008.

FUNDAÇÃO MS. **Crambe**. Disponível em:
<<http://www.fundacaoms.org.br/produto/crambe>>. Acesso em: 05 Maio 2013.

GAO, H. B.; WANG, Y.; GAO, F.; LUO, P. Studies on the Plant regeneration from single cell culture of *Crambe abyssinica*. **Hereditas**, Beijing, v. 20, p. 50-52, 1998.

GHEORGHE, R. N.; VISOIU, E.; POPESCU, C. F.; PAMFIL, D. Assesment of Genetic Stability and Fidelity of Some Micropropagated *Vitis vinifera* L. “*Feteasca neagra*” Clones by Ampelometric and RAPD Markers. **Bulletin UASVM Horticulture**, v. 66, n. 1, 2009.

GILBERT, R. A.; GLYNN, N. C.; COMSTOCK, J. C.; DAVIS, M. J. Agronomic performance and genetic characterization of sugarcane transformed for resistance to sugarcane yellow leaf virus. **Field Crops Research**, v. 111, p. 39-46, 2009.

GOEL, M. K.; KUKREJA, A. K.; BISHT, N. S. *In vitro* manipulations in St. John’s wort (*Hypericum perforatum* L.) for incessant and scale up micropropagation using adventitious roots in liquid medium and assessment of clonal fidelity using RAPD analysis. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 96, p. 1–9, 2009.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, v. 122, p 81-89, 2001.

GRANDO, F. A força do combustível verde. **Revista do CONFEA**, Brasília, v. 9, n. 22, p. 14-17, 2005.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998. v. 1, p. 183-260.

GRIGA, M. Somatic embryogenesis in grain legumes. In: STRNAD, M.; PEÁ, P.; BECK, E. (ed.). **Advances in Regulation of Plant Growth and Development**. Prague: Peres Publ., 1999. p. 223-250.

HALIAPAS, S.; YUPSANIS, T.A.; SYROS, T.D.; KOFIDIS, G.; ECONOMOU, A.S. *Petunia*×*hybrida* during transition to flowering as affected by light intensity and quality treatments. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, p. 807-815, 2008.

HAMAD, A. M.; TAHA, R. M. Effect of sequential subcultures on in vitro proliferation capacity and shoot formations pattern of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) over different incubation periods. **Scientia Horticulturae**, v. 117, n. 4, p. 329-334, 2008.

HAZARIKA, B.N. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v. 108, p. 105-120, 2006.

HEINZE, B.; SCHMIDT, J. Clonal fidelity of Norway spruce somatic embryos analysed by RAPD. In: PARDOS, J. A.; AHUJA, M. R.; ROSSELLO, R. E. (eds) **Biotechnology of Trees. Investigación Agraria Sistemas y Recursos Forestales**, INIA, p. 143-148, 1994.

IENICA. **Crops database**, <http://www.ienica.net/cropsdatabase.htm>; 2002.

IQBAL, M. M.; NAZIR, F.; ALI, S.; ASIF, M. A.; ZAFAR, Y.; IQBAL, J.; ALI, G. M. Over Expression of Rice *Chitinase* Gene in Transgenic Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Improves Resistance Against Leaf Spot. **Molecular Biotechnology**, v. 50, p. 129–136, 2012.

JAIN, S. M. Tissue cultured-derived variation in crop improvement. **Euphytica**, n. 118, p. 153-166, 2001.

JALIGOT, E.; ADLER, S.; DEBLADIS, E.; BEULÉ, T.; RICHAUD, F.; ILBERT, P.; FINNEGAN, E. J.; RIVAL, A. Epigenetic imbalance and the floral developmental abnormality of the *in vitro*-regenerated oil palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany**, v. 108, p. 1453-1462, 2011.

JALIGOT, E.; BEULÉ, T.; RIVAL, A. Methylation-sensitive RFLPs: characterisation of two oil palm markers showing somaclonal variation-associated polymorphism. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p 1263-1269, 2002.

JASPER, S. P.; BIAGGIONI, M. A. M.; SILVA, P. R. A. Comparação do custo de produção do crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) com outras culturas oleaginosas em sistema de plantio direto. **Revista Energia na Agricultura**, Botucatu, vol. 25, n. 4, p. 141-153, 2010.

JEFFERSON, M. Sustainable energy development: performance and prospects. **Renewable Energy**, v. 31, p. 57-82, 2006.

JOHANSSON, M.; KRONESTEDT-ROBARDS, E.C.; ROBARDS, A.W. Rose leaf structure in relation to different stages of micropropagation. **Protoplasma**, v. 166, p. 165-176, 1992.

JOSHI, M.; MISHRA, A.; JHA, B. Efficient genetic transformation of *Jatropha curcas* L. by microprojectile bombardment using embryo axes. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 67-77, 2011.

JOSHI, P.; DHAWAN, V. Assessment of genetic fidelity of micropropagated *Swertia chirayita* plantlets by ISSR marker assay. **Plant Biology**, v. 51, n. 1, p. 22-26, 2007.

KHAN, E. U.; FU, X. Z.; WANG, J.; FAN, Q. J.; HUANG, X. S.; ZHANG, G. N.; SHI, J.; LIU, J. H. Regeneration and characterization of plants derived from leaf *in vitro* culture of two sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) cultivars. **Scientia Horticulturae**, v. 120, n. 1, p. 70-76, 2009.

KHAN, S.V.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q.T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **Biologia Plantarum**, v. 46, n. 2, p. 161-166, 2003.

- KISHOR, R.; DEVI, H. S. Induction of multiple shoots in a monopodial orchid hybrid (*Aerides vandarum* Reichb.f × *Vanda stangeana* Reichb.f) using thidiazuron and analysis of their genetic stability. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 97, p. 121–129, 2009.
- KNIGHTS, E.G. Crambe: A North Dakota case study. A Report for the Rural Industries Research and Development Corporation, **RIRDC Publication N. W02/005**, Kingston, 2002. 25p. Disponível em: <<http://www.rirdc.gov.au>>. Acesso em: 01 Fevereiro 2014.
- KOZAI, T.; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, v. 114, p. 525-537, 2001.
- KROGAN, N. T.; LONG, J. A. Why so repressed? Turning off transcription during plant growth and development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, p. 628-636, 2009.
- KUMAR, N.; REDDY, M. P. Thidiazuron (TDZ) induced plant regeneration from cotyledonary petiole explants of elite genotypes of *Jatropha curcas*: A candidate biodiesel plant. **Industrial Crops and Products**, v. 39, p. 62-68, 2012.
- LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; WANG, L.; ELLIOTT, A.; GROF, C. P. L.; BERDING, N.; SMITH, G. R. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. **Plant Cell Rep**, v. 25, p. 1007-1015, 2006.
- LAKSHMANAN, V.; VENKATARAMAREDDY, S. R.; NEELWARNE, B. Molecular analysis of genetic stability in long term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2007.
- LAMHANEDI, M.; CHAMBERLAND, H.; TREMBLAY, F. M. Epidermal transpiration, ultrastructural characteristics and net photosynthesis of white spruce somatic seedlings in response to *in vitro* acclimatization. **Physiologia Plantarum**, v. 118, p. 554-561, 2003.
- LEE, D.W.; OBERBAUER, S.F.; JOHNSON, P.; KRISHNAPILAY, B.; MANSOR, M.; MOHAMAD, H.; YAP, S.K. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two Southeast Asian Hopea (dipterocarpaceae) species. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 4, p. 447-455, 2000.
- LEELA, T.; NARESH, B.; REDDY, M. S.; MADHUSUDHAN, N. Ch.; CHERKU, P. D. Morphological, physico-chemical and micropropagation studies in *Jatropha curcas* L. and RAPD analysis of the regenerants. **Applied Energy**, v. 88, p. 2071–2079, 2011.
- LEROY, X. J.; LEON, K.; HILY, J. M.; CHAUMEIL, P.; BRANCHARD, M. Detection of *in vitro* culture induced instability through inter-simple sequence repeat analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p. 885-891, 2001.
- LI, X.; AHLMAN, A.; LINDGREN, H.; ZHU, L. H. Highly efficient *in vitro* regeneration of the industrial oilseed crop *Crambe abyssinica*. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 170-175, 2011.

- LI, X.; AHLMAN, A.; YAN, X.; LINDGREN, H.; ZHU, L.-H. Genetic transformation of the oilseed crop *Crambe abyssinica*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 100, p. 149–156, 2010.
- LITTLE, E. L.; MAGBANUA, Z. V.; PARROT, W. A. A protocol for repetitive somatic embryogenesis from mature peanut epicotyls. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 351-357, 2000.
- LOGANATHAN, M.; MARUTHASALAM, S.; SHIU, L. Y.; LIEN, W. C.; HSU, W. H.; LEE, P. F.; YU, C. W.; LIN, C. H. Regeneration of soybean (*Glycine max* L. Merrill) through direct somatic embryogenesis from the immature embryonic shoot tip. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 46, p. 265-273, 2010.
- LOMBARDI, S.P; PASSOS, I.R.daS.; NOGUEIRA, M.C.S.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. *In vitro* shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* mast. **Brazilian Archives of biology and technology**, v. 50, n. 2, p. 239-247, 2007.
- LOURO, R.P.; SANTIAGO, L.J.M.; SANTOS, A.V.; MACHADO, R.D. Ultrastructure of *Eucalyptus grandis* x *E.urophylla* plants cultivated *ex vitro* in greenhouse and field conditions. **Trees**, v. 17, p. 11-22, 2003.
- LUTTS, S.; KINET, J. M.; BOUHARMONT, J. NaCl impact on somaclonal variation exhibited by tissue culture-derived fertile plants of rice (*Oryza sativa* L). **Journal of Plant Physiology**, v. 152, n. 1, p. 92-103, 1998.
- MACEDO, A.F.; LEAL-COSTA, M.V.; TAVARES, E.S.; LAGE, C.L.S.; ESQUIBEL, M.A. The effect of light quality on leaf production and development of *in vitro*-cultured plants of *Alternanthera brasiliana* Kuntze. **Environmental and Experimental Botany**, v. 70, p. 43-50, 2011.
- MACHADO, M.F.; BRASIL, A.N.; OLIVEIRA, L.S.; NUNES, D.L. Estudo do Crambe (*Crambe abyssinica*) como fonte de óleo para produção de biodiesel. **ENERBIO, Grupo de Pesquisa em Energias Renováveis**, UIT, Itaipava / MG. 2007. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/agricultura/39.pdf>>. Acesso em: 26 de Maio 2013.
- MAJADA, J.P.; CENTENO, M.L.; FEITO, I.; FERNANDEZ, B.; SANCHEZ-TAMEZ, R. Stomatal and cuticular traits on carnation tissue culture under different ventilation conditions. **Plant Growth Regulation**, v. 25, p. 113–121, 1998.
- MARHOLD, K.; KUDOH, H.; PAK, J.; WATANABE, K.; SPANIEL, S.; LIHOVA, J. Cytotype diversity and genome size variation in eastern Asian polyploidy Cardamine (Brassicaceae) species. **Annals of Botany**, v. 105, p. 249-264, 2010.
- MARITANO, P. F.; ALDERETE, L. M.; DE LA TORRE, M. C. P.; ESCANDÓN, A. S. *In vitro* propagation and genetic stability analysis of *Evolvulus* spp. Biotechnological tools for the exploration of native germplasm with ornamental potential. **In Vitro Cellular Development Biology – Plant**, v. 46, p. 64-70, 2010.

- MARTINS, M.; SARMENTO, D.; OLIVEIRA, M. M. Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 492-496, 2004.
- MASTEBROEK, H.D.; WALLENBURG, S.C.; VAN SOEST, L.J.M. Variation for agronomic characteristics in Crambe (*Crambe abyssinica* Hochst). **Industrial Crops and Products**, v. 2, p. 129-136, 1994.
- MAYER, J.L.S.; RIBAS, L.L.F.; BONA, C.; QUOIRIN, M. Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium* Hort. (Orchidaceae) cultivadas *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 2, p. 323-332, 2008.
- MEDINA, R.; FALOCI, M.; MARASSI, M.A.; MROGINSKI, L.A. Genetic stability in rice micropropagation. **Biocell**, v. 28, n. 1, p. 13-20, 2004.
- MIGUEL, C.; MARUM, L. An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 11, p. 3713-3725, 2011.
- MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 5, p. 14-17, 1998.
- MILLACH, S. C. K. **Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas**. Disponível em : <<http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livroorg/marcadormolecular.pdf>>. Acesso em: 12 Abr. de 2012.
- MILLAM, S.; MITCHELL, S.; CRAIG, A.; PAOLI, M.; MOSCHENI, E.; ANGELINI, L. *In vitro* manipulation as a means for accelerated improvement of some new potential oil crop species. **Industrial Crops and Products**, v. 6, p. 213-219, 1997.
- MIMANO, L. N.; MACHARIA, C. W.; WASILWA, L. A. Micro-propagation: a useful tool for rapid multiplication of oil palm (*Elaeis guineensis*) hybrids in Kenya. In: **KARI Biennial Scientific Conference**, 10, 2010, Kenya. Disponível em: <<http://www.kari.org/fileadmin/publications/10thProceedings/Volone/MicroPropagation.pdf>> . Acesso em: 04 Abr. 2012.
- MIÑANO, H. S.; GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; MARTÍN, C. Molecular characterization and analysis of somaclonal variation in chrysanthemum cultivars using RAPD markers. **Scientia Horticulturae**, v. 122, n. 2, p. 238-243, 2009.
- MODGIL, M.; GULERIA, N.; GHANI, M.; SHARMA, J. N. Identifying somaclonal variants of the apple rootstock Malling 7 resistant to white root rot. **Scientia Horticulturae**, v. 137, p. 148-155, 2012.
- MOGANEDI, K. L. M; COLPAERT, N.; BREYNE, P.; SIBARA, M. M.; GOYVAERTS, E. M. A. Determination of genetic stability of grafted marula trees using AFLP markers. **Scientia Horticulturae**, v. 111, p. 293-299, 2007.
- MOHAN, J. S. Tissue culture-derived variation in crop improvement. **Euphytica**, v. 118, p. 153-166, 2001.

MÖLLER, M. **Crambe, alternativa para a produção de óleo**. Aracajú, MS. 2007. 40 slides. Disponível em: <www.ruralsementes.com.br>. Acesso em 20 de outubro de 2012.

MORCILLO, F.; GAGNEUR, C.; ADAM, H.; RICHAUD, F.; SINGH, R.; CHEAH, S-C.; RIVAL, A.; DUVAL, Y.; TREGGAR, J. W. Somaclonal variation in micropropagated oil palm. Characterization of two novel genes with enhanced expression in epigenetically abnormal cell lines and in response to auxin. **Tree Physiology**, v. 26, p. 585-594, 2006.

MOREIRA, H.J.daC.; BRAGANÇA, H.B.N. **Manual de Identificação de Plantas Infestantes: Cultivo de Verão**. 1 ed. Campinas, 2010, 642 p. Disponível em: <https://www.fmcdireto.com.br/portal/manuais/infestantes_verao/files/assets/downloads/page0084.pdf>. Acesso em: 01 Fevereiro 2014.

MOUSAVI, M.; MOUSAVI, A.; HABASHI, A. A.; ARZANI, K. Optimization of physical and biological parameters for transient expression of *uidA* gene in embryogenic callus of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) via particle bombardment. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 16, p. 3721-3730, 2009.

MULLER, A. Armazenamento e germinação de sementes de Crambe (*Crambe abyssinica* Hochst, Brassicaceae), CAMPO GRANDE, **Anais**. CAMPO GRANDE, 2008, UCDB.

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

NAKANO, M.; NOMIZU, T.; MIZUNASHI, K.; SUZUKI, M.; MORI, S.; KUWAYAMA, S.; HAYASHI, M.; UMEHARA, H.; OKA, E.; KOBAYASHI, H.; ASANO, M.; SUGAWARA, S.; TAKAGI, H.; SAITO, H.; NAKATA, M.; GODO, T.; HARA, Y.; AMANO, J. Somaclonal variation in *Tricyrtis hirta* plants regenerated from 1-year-old embryogenic callus cultures, **Scientia Horticulturae**, v. 110, n. 4, p. 366-371, 2006.

NEVES, M. B. das; TRZECIAK, M. B.; VINHOLES, P. da S.; TILLMANN, C. A. da C.; VILLELA, F. A. **Qualidade fisiológica de sementes de crambe produzidas em Mato Grosso do Sul**. Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/livro/Agroenergia_2007/Agroener/trabalhos/Outras%20culturas_11_OK/Neves_1.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2010.

NUGENT, G. D.; COYNE, S.; NGUYEN, T. T.; KAVANAGH, T. A.; DIX, P. J. Nuclear and plastid transformation of *Brassica oleracea* var. *botrytis* (cauliflower) using PEG-mediated uptake of DNA into protoplasts. **Plant Science**, v. 170, p. 135-142, 2006.

OH, T. J.; CULLIS, M. A.; KUNERT, K.; ENGELBORGHES, I.; SWENNEN, R.; CULLIS, C. A. Genomic changes associated with somaclonal variation in banana (*Musa* spp.). **Physiology Plant**, v. 129, p. 766-774, 2007.

OLIVEIRA, L.M.de; PAIVA, R.; ALOUFA, M.A.I.; CASTRO, E.M.de; SANTANA, J.R.F.de; NOGUEIRA, R.C. Efeitos de citocininas sobre a anatomia foliar e o crescimento de *Annona glabra* L. durante o cultivo *in vitro* e *ex vitro*. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, 2008.

- OLMOS, S. E.; LAVIA, G.; DI RENZO, M.; MROGINSKI, L.; ECHENIQUE, V. Genetic analysis of variation in micropropagated plants of *Melia Azedarach* L. **In vitro Cellular Development Biology – Plant**, v. 38, p. 617-622, 2002.
- OPLINGER, E.S.; OELKE, E.A.; KAMINSKI, A.R.; PUTNAM, D.H.; TEYNOR, T.M.; DOLL, J.D.; KELLING, K.A.; DURGAN, B.R.; NOETZEL, D.M. **Crambe: alternative field crops manual**. St. Paul: **University of Wisconsin and University of Minnesota**, 2000. Disponível em: <<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/afcm/crambe.html>>. Acesso em: 19 de abril de 2012.
- OSÓRIO, M.L.; GONÇALVES, S.; OSÓRIO, J.; ROMANO, A. Effects of CO₂ concentration on acclimatization and physiological responses of two cultivars of carob tree. **Biologia Plantarum**, v. 49, n. 2, p. 161-167, 2005.
- PACHECO, G.; GAGLIARDI, R. F.; VALLS, J. F. M.; MANSUR, E. Micropropagation and *in vitro* conservation of wild *Arachis* Species. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 99, p. 239-249, 2009.
- PALMER, C. D.; KELLER, W. A. Somatic embryogenesis in *Crambe abyssinica* Hochst. ex R.E. Fries using seedling explants. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 104, n. 1, p. 91-100, 2011.
- PALOMBI, M. A.; DAMIANO, C. Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev). **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 1061-1066, 2002.
- PARVEEZ, G. K. A.; CHOWDHURY, M. K. U.; SALEHB, N. M. Physical parameters affecting transient GUS gene expression in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) using the biolistic device. **Industrial Crops and Products**, v. 6, p. 41-50, 1997.
- PATHAK, H.; DHAWAN, V. ISSR assay for ascertaining genetic fidelity of micropropagated plants of apple rootstock Merton 793. **In Vitro Cellular Development Biology - Plant**, v. 48, p. 137-143, 2012.
- PAUL, A.; THAPA, G.; BASU, A.; MAZUMDAR, P.; KALITA, M. C.; SAHOO, L. Rapid plant regeneration, analysis of genetic fidelity and essential aromatic oil content of micropropagated plants of Patchouli, *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. – An industrially important aromatic plant. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 366-374, 2010.
- PAULOSE, B.; KANDASAMY, S.; DHANKHER, O. P. Expression profiling of *Crambe abyssinica* under arsenate stress identifies genes and gene networks involved in arsenic metabolism and detoxification. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 108, p. 1-12, 2010.
- PEREDO, E. L.; REVILLA, M. A.; GARCÍA, R. A. Assessment of genetic and epigenetic variation in hop plants regenerated from sequential subcultures of organogenic calli. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, n. 10, p. 1071-1079, 2006.
- PEREZ, S.C.J.G.A. Limites de temperatura e estresse térmico na germinação de sementes de *Peltophorium dubium*. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, n. 1, p. 134-142, 1998.

- PHILLIPS, R. L.; KAEPLER, S. M.; OLHOFT, P. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA (PNAS)**, v. 91, p. 5222-5226, 1994.
- PIOLA, F.; ROHR, R.; HEIZMANN, P. Rapid detection of genetic variation within and among *in vitro* propagated cedar (*Cedrus libani* Loudon) clones. **Plant Science**, v. 141, p. 159-163, 1999.
- PITOL, C. **Cultura do crambe**. Tecnologia e produção: milho safrinha e culturas de inverno 2008. Fundação MS, 2008. Disponível em: <www.fundacaoms.org.br>. Acesso em: 14 de maio de 2013.
- PITOL, C.; BROCH, D.L.; ROSCOE, R. **Tecnologia e Produção: Crambe 2010**. Maracaju: Fundação MS, 2010. 60p.
- POSPÍŠILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLEČEK, P.; HASEL, D.; PLZÁKOVÁ, S. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, v. 42, n. 4, p. 481-497, 1999.
- QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P.; BOXUS, P. Un premier bilan de dix années de recherche sur les cultures de meristemes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux (in French), Comptendu des recherches, **Station des Cultures Fruitières et Marrichères de Gembloux**, p. 93-117, 1977.
- RADHAKRISHNAN, R.; KUMARI, B. D. R. Changes in Protein Content in Micropropagated and Conventional Soybean Plants (*Glycine max* (L.) Merr.). **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 2, p. 186-189, 2009.
- RAHMAN, M. H.; RAJORA, O. P. Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*). **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 531-536, 2001.
- RAI, S. K.; SHARMA, M.; JAIN, M.; AWASTHI, A.; PURSHOTTAM, D. K.; NAIR, N. K.; SHARMA, A. K. Rapid *in vitro* production of cloned plants of *Uraria picta* (Jacq.) DC – a rare medicinal herb in long-term culture. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1929-1937, 2010.
- RANI, V.; RAINA, S. N. Genetic fidelity of organized meristem derived micropropagated plants: a critical reappraisal. **In Vitro Cellular Development Biology – Plant**, v. 36, p. 319-330, 2000.
- RAO, N.V.; INAMDAR, J.A. Leaf Architectural Studies in the Brassicaceae. **The Botanical magazine: Tokyo**, v. 96, p. 15-28, 1983.
- REDDY, P. M.; SARAL, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, p. 9-17, 2002.
- RESENDE, R.K.S.; CASTRO, E.M.; PEREIRA, F.D. Anatomia foliar de seis espécies de anonáceas cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2362-2365, 2008.

- RODRIGUES, L.R.; OLIVEIRA, J.M.S.de; MARIATH, J.E.deA. Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 2, n. ¾, p. 159-167, 2004.
- ROMANO, A.; MARTINS-LOUCAO, M.A. Water loss and morphological modifications in leaves during acclimatization of cork oak micropropagated plantlets. **Acta Horticulturae**, n. 616, p. 439-442, 2003.
- ROSCOE, R.; DELMONTES, A.M.A. Crambe é nova opção para biodiesel. **Agriannual 2009**. São Paulo: Instituto FNP, 2008. p. 40-41.
- ROSCOE, R.; RICHETTI, A.; MARANHO, E. Análise de viabilidade técnica de oleaginosas para produção de biodiesel em Mato Grosso do Sul. **Revista de Política Agrícola**, v. 16, p. 48-59, 2007.
- SAKER, M. M.; BEKHEET, S. A.; TAHA, H. S.; FAHMY, A. S.; MOURSY, H. A. Detection of somaclonal variation in tissue culture-derived date palm plants using isoenzyme analysis and RAPD fingerprints. **Biologia Plantarum**, v. 43, p. 347-351, 2000.
- SÁNCHEZ, M. C.; MARTÍNEZ, M. T.; VALLADARES, S.; FERRO, E.; VIÉITEZ, A. M. Maturation and germination of oak somatic embryos originated from leaf and stem explants: RAPD markers for genetic analysis of regenerants. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 699-707, 2003.
- SANTOS, M. do D. M. dos. **Micropropagação do abacaxizeiro ornamental [*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindley) Coppens & Leal] e avaliação da fidelidade genotípica dos propágulos**. 2008. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Brasília (UNB), Brasília, 2008.
- SARKAR, T.; ANAND, K. G. V.; REDDY, M. P. Effect of nickel on regeneration in *Jatropha curcas* L. and assessment of genotoxicity using RAPD markers. **Biometals**, v. 23, p. 1149-1158, 2010.
- SHARMA, S.; KUMAR, N.; REDDY, M. P. Regeneration in *Jatropha curcas*: Factors affecting the efficiency of *in vitro* regeneration. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 943-951, 2011.
- SHARMA, S.; PAMIDIMARRI, D. V. N. S.; ANANDA, K. G. V.; REDDY, M. P. Assessment of genetic stability in micropropagules of *Jatropha curcas* genotypes by RAPD and AFLP analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 1003-1009, 2011.
- SHUKLA, A.; SAWHNEY, V. K. Comparative regenerative ability of internodal segments of wild type and a genic male sterile line of rapeseed (*Brassica napus*) cultured *in vitro*. **Plant Science**, v. 79, p. 95-98, 1991.
- SILVA, L.M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V.J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botanica Brasílica**, v. 19, n. 1, p. 183-194, 2005.

SILVA, S. T. da S.; DUTRA, C. Direito e energia: biodiesel a partir de oleaginosas - Desafios e Perspectivas. In: **Encontro da Associação Nacional de Pesquisa e Pós-Graduação em Ambiente e Sociedade**, 4, 2008, Brasília. Disponível em: <<http://www.anppas.org.br/encontro4/cd/ARQUIVOS/GT4-1008-857-20080517114056.pdf>>. Acesso em: 04 Abr. 2012.

SINGH, A.; REDDY, M. P.; CHIKARA, J.; SINGH, S. A simple regeneration protocol from stem explants of *Jatropha curcas* – A biodiesel plant. **Industrial Crops and Products**, v. 31, p. 209-213, 2010.

SINGH, S. K.; RAI, M. K.; SAHOO, L. An improved and efficient micropropagation of *Eclipta alba* through transverse thin cell layer culture and assessment of clonal fidelity using RAPD analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 328-333, 2012.

SMYKAL, P.; VALLEDOR, L.; RODRIGUEZ, R.; GRIGA, M. Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). **Plant Cell Reports**, v. 26, p. 1985-1998, 2007.

SONEJI, J. R.; RAO, P. S.; MHATRE, M. Suitability of RAPD for analyzing spined and spineless variant regenerants of pineapple (*Ananas comosus* L.Merr.). **Plant Molecular Biology Reports**, v. 20, p. 307-308, 2002.

SOUZA, A.D.V.; VIANNA, A.C.A.; SOARES, C.M.; IDA, E.I.; OLIVEIRA, L.C.S.; FAVARO, S.P. Caracterização química de sementes e tortas de pinhão-manso, nabo-forrageiro e crambe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 10, p. 1328-1335, 2009.

SREEDHAR, R. V.; LAKSHMANAN, V.; BHAGYALAKSHMI, N. Genetic fidelity of long-term micropropagated shoot cultures of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) as assessed by molecular markers. **Biotechnology Journal**, v. 2, p. 1007-1013, 2007.

TASKI-AJDUKOVIC, K.; VASIC, D.; NAGL, N. Regeneration of interspecific somatic hybrids between *Helianthus annuus* L. and *Helianthus maximiliani* (Schrader) via protoplast electrofusion. **Plant Cell Reports**, v. 25, p. 698–704, 2006.

TOEBE, M.; BRUM, B.; LOPES, S.J.; CARGNELUTTI FILHO, A.; SILVEIRA, T.R.da. Estimativa da área foliar de *Crambe abyssinica* por discos foliares e por fotos digitais. **Ciência Rural**, Santa Maria v. 40, n. 2, p. 475-478, 2010.

TRIPATHI, S. B.; MATHISH, N. V.; GURUMURTHI, K. Use of genetic markers in the management of micropropagated Eucalyptus germplasm. **New Forest**, v. 31, p. 361-372, 2006.

TRZECIAK, M. B.; NEVES, M. B. das; VINHOLES, P. da S.; VILLELA, F. M. Utilização de sementes de espécies oleaginosas para produção de biodiesel. **Informativo ABRATES**, v. 18, n. 1, 2, 3, p. 30-38, 2008.

TULMANN NETO, A.; MENDES, B. M. J; ANDO, A. Progressos na indução e uso de mutações *in vitro*. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998. v. 1, p. 459-506.

- UENO, O. Structural and biochemical characterization of the C3–C4 intermediate *Brassica gravinae* and relatives, with particular reference to cellular distribution of Rubisco. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 15, p. 5347–5355, 2011.
- VAZQUEZ, A. M. Insight into somaclonal variation. **Plant Biosystems**, v. 135, p. 57–62, 2001.
- VEDANA, U. Crambe (*Crambe abyssinica*) promissora planta para o Biodiesel. **Revista Biodieselbr**, 03 de maio de 2007. Disponível em: <www.biodieselbr.com>. Acesso em 15 de Maio de 2012.
- VIDOZ, M. L.; REY, H. Y.; GONZALEZ, A. M.; MROGINSKI, L. A. Somatic embryogenesis and plant regeneration through leaf culture in *Arachis glabrata* (Leguminosae). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 26, n. 1, p. 59-66, 2004.
- VOLLMANN, J.; RUCKENBAUER, P. Agronomic performance and oil quality of crambe as affected by genotype and environment. **Bodenkultur**, v. 44, p. 335-343, 1993.
- VOLLMANN, J.; RÜCKENBAUER, P. Estimation of Outcrossing Rates in Crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. Ex. R. E. Fries) Using a Dominant Morphological Marker Gene. **Die Bodenkultur**, v. 42, p. 361-366, 1991.
- WANG, Y. P.; SNOWDON, R. J.; RUDLOFF, E.; WEHLING, P.; FRIEDT, W.; SONNTAG, K. Cytogenetic characterization and *faeI* gene variation in progenies from asymmetric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Crambe abyssinica*. **Genome**, v. 47, p. 724-731, 2004.
- WANG, Y. P.; SONNTAG, K.; RUDLOFF, E. Development of rapeseed with high erucic acid content by asymmetric somatic hybridization between *Brassica napus* and *Crambe abyssinica*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, p. 1147-1155, 2003.
- WANG, Y. P.; TANG, J. S.; CHU, C. Q.; TIAN, J. A preliminary study on the introduction and cultivation of *Crambe abyssinica* in China, an oil plant for industrial uses. **Industrial Crops and Products**, v. 12, p. 47-52, 2000.
- WANG, Y.; PENG, P. Intergeneric hybridization between Brassica species and *Crambe abyssinica*. **Euphytica**, v. 101, p. 1-7, 1998.
- WARWICK, S.I.; GUGEL, R.K. Genetic variation in the *Crambe abyssinica* – *C. hispanica* – *C. glabrata* complex. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 50, p. 291-305, 2003.
- WEISS, E.A. Oilseed crops. London: **Blackwell Science**, 2000. 364p.
- WHITE, G. A.; SOLT, M. Chromosome numbers in Crambe, Crambella, and Hemicrambe. **Crop Science**, v. 18, p. 160-161, 1978.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

YASODHA, R.; SUMATHI, R.; GURUMURTHI, K. Micropropagation for quality propagule in plantation forestry. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 159-170, 2004.

ZHAO, J.; ZHANG, Q.; XIE, J.; HUNG, C.-Y.; CUI, J.; HENNY, R. J.; CHEN, J. Plant regeneration via direct somatic embryogenesis from leaf and petiole explants of *Epipremnum aureum* 'Marble Queen' and characterization of selected variants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 1, 2012.

ZIA, M.; MIRZA, B.; MALIK, S. A.; CHAUDHARY, M. F. Expression of *rol* genes in transgenic soybean (*Glycine max* L.) leads to changes in plant phenotype, leaf morphology, and flowering time. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 103, p. 227-236, 2010.

ZOBAYED, S.M.A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Leaf anatomy of *in vitro* tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. **Plant Science**, v. 161, p. 537–538, 2001.

ZOGLAMI, N.; BOUAMAMA, B.; KHAMMASSI, M.; GHORBEL, A. W. Genetic stability of long-term micropropagated *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. plantlets as assessed by molecular tools: Perspectives for *in vitro* conservation. **Industrial Crops and Products**, v. 36, p. 59-64, 2012.

CAPÍTULO I

GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *Crambe abyssinica* HOCHST

Germinação *in vitro* de *Crambe abyssinica* Hochst

RESUMO

A germinação *in vitro* para *Crambe abyssinica* Hochst é importante tanto para a propagação massal, quanto como ferramenta para aplicação de outras técnicas biotecnológicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes meios de cultura, condições físicas da semente e condições de luminosidade na germinação *in vitro* de crambe. O experimento foi conduzido em esquema de parcelas sub-subdivididas, tendo nas parcelas as condições luminosas (presença ou ausência de luz), nas subparcelas os meios de cultura (MS, WPM e B5) e nas sub-subparcelas as condições físicas da semente (presença ou ausência de pericarpo). A porcentagem de germinação foi maior nos meios B5 e WPM, com médias de 99,37% e 97,50%, respectivamente, independente da luz e das condições físicas da semente. Os maiores valores de IVG foram observados também nesses meios com média de 3,87 na ausência de luz em sementes sem pericarpo. O comprimento da parte aérea foi influenciado pela composição do meio de cultura e condição luminosa, em que, os meios B5 e WPM apresentaram os maiores valores na ausência de luz, 13,2 e 11,7 cm, respectivamente. Os comprimentos das raízes foram significativamente maiores nos meios MS e B5, com médias de 6,8 e 5,0 cm, respectivamente, em relação ao meio WPM, cuja média foi de 3,5 cm. Para as variáveis avaliadas, as condições mais favoráveis à germinação e desenvolvimento das plantas *in vitro* são em meio B5 ou WPM, na presença ou ausência de pericarpo e na presença de luz.

Palavras-chave: crambe, biodiesel, germinação, meios de cultura, condição de luminosidade.

ABSTRACT***In vitro* germination of *Crambe abyssinica* Hochst**

The *in vitro* germination to *Crambe abyssinica* Hochst is important for mass propagation, and as a tool for implementation of other biotechnological techniques. The objective of this work was to evaluate the effects of different culture media, physical conditions of the seed, light condition of *in vitro* germination of crambe. The experiment was conducted in a split split-plots, with parcels of light conditions (presence or absence of light), in the subplots the culture media (MS, WPM and B5) and in the sub-subplots the physical conditions (presence or absence of pericarp). The germination percentage was higher in B5 and WPM media, with averages of 99.37% and 97.50%, respectively, independent of light conditions and the physical seed. The highest values of IGV were also observed in these media with an average of 3.87 in the absence of light in seeds without pericarp. The length of the shoot was influenced by the composition of the culture media and light condition, in which the media B5 and WPM obtained the highest value in the absence of light, 13.2 and 11.7 cm, respectively. The lengths of the roots were significantly higher in MS and B5 media, with averages of 6.8 and 5.0 cm, respectively, compared to WPM, which averaged 3.5 cm. All the variables, the most favorable conditions for *in vitro* germination and seedling development are in B5 medium or WPM, in the presence or absence of the pericarp and in the presence of light.

Key words: crambe, biodiesel, germination, culture media, light condition

1- INTRODUÇÃO

O crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) é uma planta herbácea anual pertencente à família Brassicaceae, originária da Etiópia (JUDD et al., 2009). A espécie é destinada basicamente à produção de forragem (30 a 32% de proteína bruta) que tem sido bastante cultivada visando à extração de óleo vegetal (NEVES et al., 2007).

Com os atuais incentivos à busca de fontes de energias renováveis, a cultura de *C. abyssinica* vem ganhando papel de destaque na produção de biodiesel por suas diversas vantagens, como: (a) rápido ciclo de vida (colhida em torno de 90 dias), (b) alta produção de biomassa, (c) alta produção de sementes (1.000 e 1.500 kg ha⁻¹), (d) menor custo de produção em relação a outras fontes oleaginosas como, canola, girassol e soja (JASPER; BIAGGIONI; SILVA, 2010), (e) um percentual de óleo total na semente entre 32 e 38%, superando, por exemplo, o percentual da soja (PAULOSE; KANDASAMY; DHANKHER, 2010), (f) potencial de fitorremediação, eficiente na descontaminação de arsênio, cromo e outros metais pesado (ARTUS, 2006), e elevado percentual de ácido erúico no óleo extraído das sementes (50 a 60%) sendo útil na indústria de plástico e lubrificante (PITOL, 2008).

Devido aos poucos trabalhos realizados com crambe abre-se um vasto campo de investigações científicas que tenham como objetivo desenvolver as potencialidades dessa cultura e, conseqüentemente, melhorar os aspectos agrônômicos e tecnológicos para seu emprego na indústria de biodiesel. No entanto, a qualidade da semente e a emergência uniforme são de fundamental importância para atingir uma elevada produtividade e a sustentabilidade econômica da cultura (COSTA et al., 2010).

Nesse contexto, as técnicas de cultivo *in vitro*, dentre elas a germinação *in vitro*, são importantes tanto para uma eficiente propagação massal, quanto como ferramenta para aplicação de outras técnicas biotecnológicas. Os vários tipos de respostas morfogênicas *in vitro* apresentadas por diferentes espécies fazem com que seja necessário o estabelecimento de condições específicas, como meio nutritivo e luminosidade, adequadas para um eficiente processo de estabelecimento *in vitro* da cultura (RADMANN et al., 2009).

O estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes meios de cultura, condições físicas da semente e condições de luminosidade na germinação *in vitro* de crambe.

2- MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo. Foram utilizadas sementes de *C. abyssinica* da cultivar FMS brilhante, safra de 2010, obtidas com a Fundação MS, localizada em Maracajú, Mato Grosso do Sul.

O experimento foi conduzido em esquema de parcelas sub-subdivididas, tendo nas parcelas as condições de luminosidade na sala de crescimento, nas subparcelas os meios de cultura e nas sub-subparcelas as condições físicas da semente, em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 4 repetições, sendo a repetição constituída por um frasco com 10 sementes (contendo 40 mL de meio).

Para os ensaios de germinação *in vitro* as sementes foram divididas em dois lotes, o primeiro representado por sementes com o pericarpo e sem pericarpo, enquanto no segundo as sementes foram submetidas à retirada manual do pericarpo. A seguir, ambos foram submetidos ao seguinte processo de desinfestação: As sementes foram inicialmente lavadas em água corrente e detergente neutro comercial por 5 minutos e, em condições assépticas em câmara de fluxo laminar, imersas em álcool 70% (v/v) por 1 minuto seguido pela imersão em hipoclorito comercial (2-2,5% de cloro ativo) por 7 minutos, sendo posteriormente lavadas três vezes com água destilada autoclavada.

Três meios de cultura foram testados: MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) e B5 (GAMBORG; MILLER; OJIMA, 1968), todos suplementados com ágar (7 g.L^{-1}), pH ajustado para $5,8 \pm 1$ e autoclavados a 121°C por 20 minutos. As condições de cultivo da sala de crescimento foram ajustadas para temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, e fotoperíodo de 16 horas de luz branca do tipo luz do dia (fluorescentes), com $25,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de fluxos de fótons fotossintéticos. As sementes submetidas a duas condições de luminosidade: fotoperíodo 16/8 horas (luz/escuro) e escuro.

As variáveis avaliadas após 10 dias de inoculação das sementes foram: Porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de plantas normais (%PN), comprimento da parte aérea (PA) e raiz (CR), com auxílio de paquímetro graduado, e massa fresca total (MF), quantificada por meio de pesagem em balança de precisão.

As avaliações de porcentagem de germinação foram realizadas diariamente e sempre no mesmo período do dia, computando-se o número de sementes que apresentaram protrusão da

raiz primária com comprimento ≥ 2 mm. No final do experimento, o resultado de germinação foi expresso em porcentagem média.

O IVG foi avaliado diariamente, por meio da fórmula de Maguire (1962): $IVG = G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots + G_n/N_n$, onde: G_1, G_2, G_n = número de plantas germinadas na primeira, segunda, até a última contagem e N_1, N_2, N_n = número de dias desde a primeira, segunda, até a última contagem.

Para análise de variância, os dados em porcentagens foram transformados em arco-seno $\sqrt{x/100}$ e os dados do IVG em $\sqrt{x + 0,5}$, porém nas tabelas estão apresentados os dados originais.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 1$ e 5%), utilizando-se software Assistat versão 7.6 beta (SILVA; AZEVEDO, 2009).

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve significância na interação entre os três fatores testados para nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 1). Para porcentagem de germinação e comprimento de raiz, houve diferença significativa apenas nos meios de cultura testados ($p \leq 0,1$).

Contudo, para o IVG e comprimento da parte aérea, observou-se significância na interação entre os meios de cultura e a condição física das sementes, além de uma significância a 5% para as condições luminosas. Na variável massa fresca total observou-se diferença estatística entre os meios de cultura testados e as condições de luminosidade.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de plantas normais (%PN), comprimento de parte aérea (PA), comprimento de raiz (CR) e massa fresca total (MF) de *C. abyssinica* após 10 dias de inoculação

FV	GL	Quadrados Médios					
		%G	IVG	%PN	PA	CR	MF
Condição luminosa (A)	1	0,0042 ^{ns}	0,8034*	0,0243 ^{ns}	99,4752**	4,0252 ^{ns}	0,0118**
Erro A	6	0,0260	0,1328	0,0292	3,4599	2,9166	0,0007
Meio de cultura (B)	2	0,8692**	3,6872**	0,2089 ^{ns}	91,6302**	44,1458**	0,0144*
A x B	2	0,0269 ^{ns}	0,2382 ^{ns}	0,0385 ^{ns}	14,0839**	0,2558	0,0030 ^{ns}
Erro B	12	0,0303	0,1088	0,0610	1,7776	5,0055	0,0025
Condição física (C)	1	0,1485 ^{ns}	3,9045**	0,0040 ^{ns}	5,2668 ^{ns}	9,2752 ^{ns}	0,0020 ^{ns}
A x C	1	0,0500 ^{ns}	0,2898 ^{ns}	0,0290 ^{ns}	3,9102 ^{ns}	1,5768 ^{ns}	0,0007 ^{ns}
B x C	2	0,1439 ^{ns}	0,9562*	0,1433 ^{ns}	0,0468*	3,3808 ^{ns}	0,0024 ^{ns}
A x B x C	2	0,0096 ^{ns}	0,0167 ^{ns}	0,0041 ^{ns}	2,4739 ^{ns}	4,7775 ^{ns}	0,0001 ^{ns}
Erro C	18	0,0440	0,2169	0,0561	3,2547	2,9047	0,0007
CV Parcela (%)	-	11,54	10,14	12,37	20,25	33,07	12,57
CV Subparcela (%)	-	12,45	9,18	17,86	14,52	43,32	23,58
CV Sub-subparcela (%)	-	15,01	12,96	17,12	19,64	33,00	13,04

** , * significativos a 1 e 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente;

^{ns}: não significativo a 5% pelo teste F;

CV(%): coeficiente de variação.

A porcentagem de germinação não foi influenciada pelas condições de luminosidade e condições físicas testadas, demonstrando que nessa situação não houve exigências fotoblásticas, e que o pericarpo do fruto não dificulta o processo de protrusão da radícula (Tabela 1). Barros et al. (2009), avaliando a porcentagem de germinação em casa de vegetação, observaram que a remoção do pericarpo das sementes de crambe não influenciou a germinação, sendo os resultados similares aos obtidos com sementes intactas, 80% e 82%, respectivamente. Entretanto, Ruas et al. (2010), avaliando a embebição e germinação de sementes de crambe acondicionadas em papel toalha, verificaram que o pericarpo afetou significativamente o processo de germinação, alcançando 89,71% de germinação em sementes sem pericarpo contra 43,71% na ausência deste.

Os resultados de porcentagem de germinação não diferiram estatisticamente nos meios WPM (97,50%) e B5 (99,37%), tendo o MS demonstrado um valor significativamente inferior (Tabela 2). O processo de germinação *in vitro* teve início logo no primeiro dia após a inoculação, com a protrusão da radícula. Foi observado que os três meios de cultura (MS, B5

e WPM) promoveram a germinação de sementes de crambe de forma satisfatória, apresentando valores superiores aos relatados por Martins, Costa e Lopes (2011) (80%), Masetto et al. (2011) (76%), Ruas et al. (2010) (89,43%), Dahlke e Simonetti (2010) (80%) e Barros et al. (2009) (82%).

Tabela 2. Porcentagem de germinação de sementes de *C. abyssinica* em diferentes meios de cultura, dez dias após inoculação

Meio de cultura	Médias (%)
MS	76,87 b
WPM	97,50 a
B5	99,37 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

O meio MS tem sido amplamente utilizado para a germinação *in vitro* de diversas espécies oleaginosas (ROCHA et al., 2003; FURTADO et al., 2007; NUNES et al., 2008; COSTA et al., 2010; SOARES et al., 2011), contudo, a maior porcentagem de germinação de sementes de crambe, nos meios nutritivos B5 e WPM em relação ao meio MS deveu-se, provavelmente, à diminuição do potencial osmótico promovido pela redução das concentrações de macro, micronutrientes e, principalmente da sacarose (20 g.L⁻¹ em B5 e WPM e 30 g.L⁻¹ em MS). Resultados semelhantes foram relatados por Soares et al. (2009), trabalhando com moreira (*Maclura tinctoria* D. Don ex Steud) e Gomes (1999) com mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), em que, obtiveram maior porcentagem de germinação de sementes em meios suplementados com menores concentrações de sacarose. Segundo George, Hall e De Klerk (2008), níveis elevados de sacarose no meio podem tornar a água indisponível para a embebição das sementes, impossibilitando o início da germinação.

Em relação ao IVG, houve diferença significativa entre as condições luminosas pelo teste F (Tabela 1), em que nas sementes submetidas à condição de escuro o resultado foi de 13,65, e na condição de fotoperíodo 16/8 horas foi de 12,07. Contrariando os resultados obtidos neste trabalho, Martins, Costa e Lopes (2011), estudando a influência da luz na germinação de sementes de *C. abyssinica* em BOD sob temperatura constante de 25 °C, constataram que o IVG das sementes germinadas na presença de luz foi maior (5,14) que na

ausência desta (1,57), e ressaltaram ainda que, mesmo na ausência de luz, há a mobilização das reservas energéticas e a ocorrência do processo germinativo, no entanto, esse processo é fracionado em função do tempo.

Guimarães et al. (2010), testando a influência da luz na germinação em papel toalha de sementes de *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae), concluíram que houve diferença significativa entre as condições luminosas, sendo que a presença de luz aumentou o IVG, no entanto, assim como no presente estudo, não se restringiu a essa condição. Espécies dessa mesma família, sob as mesmas condições, também demonstraram que, durante a germinação, essas sementes foram indiferentes à luz (FERREIRA; RANAL, 1999; ELLIS, HONG; ROBERTS, 1989). Segundo Lopes et al. (2005), essa espécie não possui necessidade específica da luz para a germinação, sendo então classificada como fotoblástica neutra.

Na tabela 3, encontram-se os valores do IVG, em função dos meios de cultura e das condições físicas da semente. Pode ser notado que o maior valor foi encontrado utilizando-se o meio WPM com sementes sem pericarpo (16,09), contudo não existe diferença estatística entre os meios testados dentro desse fator físico. As sementes germinadas no meio MS com pericarpo obtiveram o menor valor do IVG (6,08), diferindo significativamente das outras condições testadas.

Tabela 3. Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *C. abyssinica* em diferentes meios de cultura e condições físicas da semente, avaliados durante dez dias após inoculação

Meio de cultura	Condição física	
	Presença de pericarpo	Ausência de pericarpo
MS	6,08 bB	12,87 aA
WPM	13,23 aA	16,09 aA
B5	13,61 aA	15,29 aA

Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na coluna ou maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Neves et al. (2007), estudando a qualidade fisiológica de sementes de crambe semeadas em papel toalha, evidenciaram a inferioridade do IVG em sementes com pericarpo em relação às sementes com pericarpo, apresentando valores próximos de 6,3 e 2,2, respectivamente. Ruas et al. (2010) afirmaram que as sementes de crambe possuem capacidade de absorção de água mesmo quando envolvidas pelo seu pericarpo. Apesar disso, o referido trabalho concluiu

que o pericarpo que envolve a semente oferece algum tipo de resistência à emissão da radícula durante o processo de germinação.

Em todos os tratamentos aqui testados, observaram-se valores expressivos de plantas normais, e não houve significância na análise de variância para nenhum dos fatores testados. A média geral observada foi de 92% de plantas normais no experimento. Portanto, as condições *in vitro* as quais o crambe foi submetido no presente trabalho não compromete significativamente o estabelecimento dessas plantas.

Em relação à variável comprimento de parte aérea (PA), na Tabela 4, pode ser observado que os maiores valores foram obtidos na condição de escuro em relação à luz, com as maiores médias encontradas no meio B5 (13,25 cm) e WPM (11,71 cm), ambas diferenciando significativamente do meio MS (6,91 cm). Martins, Costa e Lopes (2011), germinando sementes de crambe em recipientes do tipo gerbox, em ausência ou presença de luz e sob temperatura constante de 25 °C, encontraram resultados contrários aos obtidos no presente trabalho, onde as plantas germinadas na luz apresentaram maiores tamanhos de parte aérea (8,61 cm) em relação às daquelas do escuro (7,10 cm).

Tabela 4. Comprimento da parte aérea (cm) de plantas de *C. abyssinica* em diferentes meios de cultura e condições luminosas, dez dias após inoculação

Meio de cultura	Condição luminosa	
	Presença de luz	Ausência de luz
MS	6,00 bA	6,91 bA
WPM	8,63 aB	11,71 aA
B5	8,60 aB	13,25 aA

Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Maiores valores do comprimento da parte aérea são esperados na condição de escuro, pois plantas mantidas no escuro por determinado tempo se apresentam com fenótipo de estioladas, com hipocótilos esbranquiçados e de aspecto translúcido (RAVEN; EVERT; EICHORN, 2007; TAIZ; ZEIGER, 2009). Segundo os autores, isso é resultado do produto da inibição do desenvolvimento de cloroplastos e redução nos conteúdos de pigmentos fotossintéticos. Os efeitos morfológicos observados neste trabalho incluíram a coloração branca, alongamento excessivo do hipocótilo, aumento da suculência, não desenvolvimento

do epicótilo, características essas que inviabilizam a retirada de alguns explantes para outras aplicações na cultura de tecidos. Portanto, por mais que se tenha observado valores satisfatórios e significativos no crescimento da parte aérea no escuro, as plantas desenvolvidas na presença de luz se tornam mais adequadas e úteis para programas de propagação vegetativa *in vitro*.

A presença ou ausência do pericarpo das sementes não influenciou o comprimento da parte aérea das plantas cultivadas nos três meios de cultura (Tabela 5). As maiores médias foram encontradas nos meios B5 e WPM, sendo os tratamentos estatisticamente iguais entre si e superiores em relação ao meio MS.

Segundo Kanashiro et al. (2007) e Grossi (2000), a alta concentração de NH_4^+ e NO_3^- presentes na formulação do meio MS poderia inibir o desenvolvimento, a morfogênese e o crescimento das plantas *in vitro*. Esse retardo no desenvolvimento da parte aérea pode ter refletido no tamanho reduzido da parte aérea no meio MS comparando-se com os demais tratamentos, indicando que uma menor relação $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ seria necessária para obter melhores resultados.

Tabela 5. Comprimento da parte aérea (cm) de plantas de *C. abyssinica* em diferentes meios de cultura e condições físicas da semente, dez dias após inoculação

Meio de cultura	Condição física	
	Presença de pericarpo	Ausência de pericarpo
MS	6,72 bA	6,18 bA
WPM	10,53 aA	9,81 aA
B5	11,28 aA	10,56 aA

Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Resultados semelhantes foram encontrados por Barros et al. (2009), avaliando tratamentos para a superação de dormência de sementes de crambe em casa de vegetação. Esses pesquisadores verificaram que as plantas germinadas em campo, independente da condição física das sementes (com ou sem pericarpo) apresentaram valores de comprimento de parte aérea numericamente iguais (4,55 cm).

A Tabela 6 apresenta os valores médios para o comprimento de raiz apenas em relação aos meios de cultura testados, pois não foi observada significância nas interações entre os fatores. Os maiores valores para essa variável foram obtidos no meio MS (6,89 cm) e B5 (5,01 cm). Os menores comprimentos foram observados no meio WPM (3,58 cm) que também não diferiu estatisticamente do B5.

Tabela 6. Comprimento de raiz (cm) de plantas de *C. abyssinica* em diferentes meios de cultura, dez dias após inoculação

Meio de cultura	Médias (cm)
MS	6,89 a
WPM	3,58 b
B5	5,01 ab

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Esses resultados corroboram com os apresentados para a variável comprimento da parte aérea, pois no meio MS as plantas inicialmente investem no seu sistema radicular, consequentemente obtendo menores resultados para comprimento da parte aérea. As diferenças encontradas nos meios MS e WPM podem estar relacionadas com a concentração de sais entre eles. O meio MS apresenta quatro vezes mais íons nitrato e amônio que o meio WPM (PASQUAL, 2001), sendo que esses íons, segundo Poddar, Vishnoi e Kothari (1997) e Mercier e Kerbauy (1998) influenciam no aumento dos níveis endógenos de auxina, o que provavelmente pode ter favorecido o desenvolvimento de raiz de forma mais acentuada. Por outro lado, Gomes e Shepherd (2000) mostraram que o comprimento da raiz de *Sinningia allagophylla* (Gesneriaceae) não apresentou diferença significativa com o aumento da concentração de nitrogênio no meio MS.

Outro fator que pode ter influenciado os resultados seria o cálcio. O meio MS possui aproximadamente 4,5 vezes mais íons cálcio que o WPM e segundo Takane (2002) e, Taiz e Zeiger (2009), esse elemento é essencial no desenvolvimento radicular, pois, diminui o pH da parede celular, tornando-a menos rígida, aumentando sua plasticidade, possibilitando o processo de alongamento da célula (RAYLE; CLELAND, 1992).

A sacarose é outro fator que poderia ter influenciado os resultados, mas não isoladamente, uma vez que o meio MS contém maior concentração de sacarose em relação aos meios WPM e B5 e, consequentemente, favoreceu o maior crescimento de raiz. Alguns

trabalhos relatam que a presença desse carboidrato é essencial para o enraizamento *in vitro* de muitas espécies (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A variável massa fresca total apresentou significância apenas para os meios de cultura e para condição luminosa (Tabela 1). Na presença de luz, a massa fresca obteve média de 0,2307 g diferindo estatisticamente da condição ausência de luz, com média de 0,1992 g. Martins, Costa e Lopes (2011), trabalhando com sementes de crambe germinadas em placa de petri em BOD, também relataram resultados semelhantes aos aqui apresentados, em que, na presença de luz, obtiveram uma massa fresca de 0,685 g, diferenciando estatisticamente do escuro, com 0,428 g, após 12 dias do início da germinação.

A luz é um fator fundamental para as plantas, pela ação direta ou indireta na regulação de seu crescimento e desenvolvimento (MORINI; MULEO, 2003), desencadeando sinais internos de ativação ou inativação de vias metabólicas nas sementes e nas plantas (BHATTACHARYA; KHUSPE, 2001; KERBAUY, 2008). A transição da condição heterotrófica do embrião, dependente das reservas nutritivas, para o estágio autotrófico da plântula é regulada pela luz (KERBAUY, 2008). A ausência ou a presença desse fator físico revela variações nos parâmetros morfológicos e fisiológicos e na otimização da produção de metabólitos primários e especiais (VICTÓRIO; LAGE, 2009).

Os meios de cultura influenciaram significativamente os valores de massa fresca total, com os meios WPM e B5 apresentado resultados superiores (0,2305 e 0,2341 g, respectivamente) ao meio MS (0,1803 g) (Tabela 7). Segundo Kanashiro et al. (2007), a massa fresca total diminui linearmente à medida que se aumenta a concentração de nitrogênio. Comportamento semelhante foi observado por Grossi (2000), em que a menor concentração desse elemento promoveu maior produção de massa fresca. Provavelmente, o cultivo em concentrações maiores de nitrogênio tenderia a diminuir a produção de massa fresca, como foi observado no presente experimento.

Tabela 7. Massa fresca total (g) de plantas de *C. abyssinica* em diferentes meios de cultura, dez dias após inoculação

Meio de cultura	Médias (g)
MS	0,1803 b
WPM	0,2305 a
B5	0,2341 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

4- CONCLUSÕES

Para todas as variáveis avaliadas, o meio B5 e o WPM se mostraram mais favoráveis à germinação *in vitro* de plantas de crambe, sendo que, a presença ou ausência de pericarpo nas sementes não influenciou nas condições aqui testadas. A presença de luz é recomendada, pois sua ausência estimula o estiolamento das plantas e o não desenvolvimento do epicótilo.

5- REFERÊNCIAS

ARTUS, N. N. Arsenic and cadmium phytoextraction potential of crambe compared with Indian mustard. **Journal of Plant Nutrition**, v. 29, p. 667-679, 2006.

BARROS, A. P. B.; MACHADO, M. F.; MARRA, S. H. do C. M.; BRASIL, A. N.; NUNES, D. N. Avaliação de tratamentos para superação de dormência em sementes de *Crambe abyssinica*. In: Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, 6. Montes Claros-MG. **Anais**. 2009. Disponível em: <http://www.enerbio.ind.br/wp-content/uploads/2011/05/a5__545-Avaliacao-de-Tratamentos-para-Superacao-de-Dormencia.pdf>. Acesso: 05 out. 2011.

BHATTACHARYA, J.; KHUSPE, S. S. *In vitro* and *in vivo* germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. **Scientia Horticulturae**, v. 91, n. 01-02, p. 39-49, 2001.

COSTA, J. da L.; SILVA, A. L. L.; SCHEIDT, G. N. LEMUS, E. A. E.; SOCCOL, C. R. Estabelecimento *in vitro* de sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) – Euphobiaceae. **Caderno de Pesquisa Série Biologia**, vol. 22, num. 3, 2010. Disponível em: <www.bioline.org.br/request?cp10012>. Acesso: 12 de out. 2011.

DAHLKE, C. F.; SIMONETTI, A. P. M. M. Interferência de diferentes temperaturas na germinação do crambe. **Cultivando o Saber**, Cascavel, v. 3, n. 4, p. 167-174, 2010.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. Quantal response of seed germination in seven genera of Cruciferae to white light of varying photon flux density and photoperiod. **Annals of Botany**, v. 63, p. 145-158, 1989.

FERREIRA, W. R.; RANAL M. A. Germinação de sementes e crescimento de plântulas de *Brassica chinensis* L. var. *parachinensis* (Bailey) Sinskaya (couve-da-malásia). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 353-361, 1999.

FURTADO, C. M.; CARVALHO, J. M. F. C.; CASTRO, J. P.; SILVA, H. Comparação da frequência de regeneração *in vitro* do amendoim (*Arachis hipogaea*), utilizando diferentes citocininas. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, v. 7, n. 1, 2007.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, n. 50, p. 151-158, 1968.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. L. **Plant propagation by tissue culture**: volume 1, the background. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. 501 p.

GOMES, G. A. **Propagação *in vitro* de Moreira (*Maclura tinctoria*)**. 1999. 91 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

GOMES, M. A. N.; SHEPHERD, S. L. K. Estudo de nutrição mineral *in vitro* relacionado à adaptação de *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae) às condições de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 23. p. 153-159, 2000.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. IN: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa Spi/Embrapa-Cnph. v. 1, p. 183-260, 1998.

GROSSI, F. 2000. **Aspectos da nutrição nitrogenada *in vitro* e atividade da redutase de nitrato em uma espécie de bromélia**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Piracicaba.

GUIMARÃES, M. A.; VIDIGAL, D. S.; LOUREITO, M. E.; DIAS, D. C. F. S.; GUIMARÃES, A. R. Influência da temperatura, luz e giberelina na germinação de sementes de *Thlaspi caerulescens* J. Presl & C. Presl (Brassicaceae). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 57, n. 3, p. 372-376, 2010.

JASPER, S. P.; BIAGGIONI, M. A. M.; SILVA, P. R. A. Comparação do custo de produção do crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) com outras culturas oleaginosas em sistema de plantio direto. **Revista Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 25, n. 4, p. 141-153, 2010.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. 2009. **Sistemática Vegetal – Um Enfoque Filogenético**. 3ª ed, Artmed. 632p.

KANASHIRO, S.; RIBEIRO, R. de C. S.; GONÇALVES, A. N.; DIAS, C. T. dos S.; JOCYS, T. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Sm. cultivada *in vitro*. **Hoehnea**, v. 34, n. 1, p. 59-66, 2007.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2008. 431 p.

LLOYD, G.; MC COWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

LOPES, J. C.; CAPUCHO, M. T.; FILHO, S. M.; REPOSSI, P. A. Influência de temperatura, substrato e luz na germinação de sementes de bertalha. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, 2005.

MAGUIRE, J. D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, p. 176-177, 1962.

MARTINS, L. M.; COSTA, F. P.; LOPES, J. C. Light influence on seed germination of crambe (*Crambe abyssinica* hochst). **Nucleus**, v. 8, n. 1, p. 405-412, 2011.

MASETTO, T. E.; QUADROS, J. de B.; RIBEIRO, D. M.; REZENDE, R. K. S.; SCALON, S. de P. Q. Potencial hídrico do substrato e teor de água das sementes na germinação do crambe. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 3, p. 511-519, 2011.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Endogenous IAA and Cytokinin levels in bromeliad shoots as influenced by glutamine and ammonium nitrate treatments. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 10, n. 3, p. 225-228, 1998.

MORINI, S.; MULEO, R. Effects of light quality on micropropagation of woody species. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p.3-35, 2003.

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

NEVES, M. B. das; TRZECIAK, M. B.; VINHOLES, P. da S.; TILLMANN, C. A. da C.; VILLELA, F. A. Qualidade fisiológica de sementes de crambe produzidas em Mato grosso do sul. Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/livro/Agroenergia_2007/Agroener/trabalhos/Outras%20culturas_11_OK/Neves_1.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2010.

NUNES, C. F.; PASQUAL, M.; SANTOS, D. N. dos; CUSTÓDIO, T. N.; ARAUJO, A. G. de. Diferentes suplementos no cultivo *in vitro* de embriões de pinhão-manso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 1, p. 9-14, 2008.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações: meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74 p.

PAULOSE, B.; KANDASAMY, S.; DHANKHER, O. P. Expression profiling of *Crambe abyssinica* under arsenate stress identifies genes and gene networks involved in arsenic metabolism and detoxification. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 108, p. 1-12, 2010.

PITOL, C. Cultura do crambe. **Tecnologia e produção: milho safrinha e culturas de inverno 2008**. Fundação MS, 2008.

PODDAR, K.; VISHNOI, R. K; KOTHARI, S. L. Plant regeneration from embryogenic callus of finger millet *Eleusine coracana* (L.) Gaertn, on higher concentrations of NH_4NO_3 as a replacement of NAA in the medium. **Plant Science**, Limerick, v. 129, p. 101-106, 1997.

RADMANN, E. B.; BIANCHI, V. J.; OLIVEIRA, R. P. de; FACHINELLO, J. C. Multiplicação *in vitro* e alongamento das brotações micropropagadas do porta-enxerto 'Tsukuba 1' (*Prunus persica* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 3, p. 656-663, 2009.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHORN, S. E. 2007. **Biologia vegetal**. 7. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 856 p.

RAYLE, D. L.; CLELAND, R. E. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, p. 1271-1274, 1992.

ROCHA, M. S.; OLIVEIRA, K. C.; COSTA, M. N.; CUNHA, A. O. CARVALHO, J. M. F. C.; SANTOS, J. W. Métodos de regeneração *in vitro* da mamoneira a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 7, n. 1, p. 647-652, 2003.

RUAS, R. A. A.; NASCIMENTO, G. B.; BERGAMO, E. P.; DAUR JÚNIOR, R. H.; ARRUDA, R. G. Embebição e germinação de sementes de crambe (*Crambe Abyssinica*). **Pesquisa agropecuária tropical**, Goiânia – GO, v. 40, p. 61-65, 2010.

SILVA, F. de A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: **WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE**, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; STEIN, V. C.; NERY, F. C.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M. de. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA_3 e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 1847-1852, 2009.

SOARES, J. D. R.; RODRIGUES, F. A.; PASQUAL, M.; NUNES, C. F.; ARAUJO, A. G. de. Germinação de embriões e crescimento inicial *in vitro* de macaúba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 5, p. 773-778, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre, Artmed, 2009.

TAKANE, R. J. **Influência da sacarose e do cloreto de cálcio na aclimação e no crescimento inicial de plântulas de *Oncidium varicosum* Lindl. & Paxton (Orchidaceae) germinadas *in vitro***. 2002. 79f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Jaboticabal, 2002.

VICTÓRIO, C. P.; LAGE, C. L. S. Effects of light qualities and growth regulators on *in vitro* flowering of *Phyllanthus tenellus* Roxb. **General and Applied Plant Physiology**, v. 35, n. 1-2, p. 44-50, 2009.

CAPÍTULO II

MICROPROPAGAÇÃO DE *Crambe abyssinica* HOCHST

Micropropagação de *Crambe abyssinica* Hochst

RESUMO

Crambe abyssinica Hochst. é uma espécie oleaginosa que produz óleo não comestível, inicialmente utilizada, no Brasil, como cultivo para cobertura do solo e alimentação animal, porém com o estímulo à produção e uso de energias renováveis, surgiu como alternativa interessante para a produção de biodiesel. O objetivo deste trabalho foi descrever um protocolo para micropropagação de crambe utilizando como explante segmentos apicais. As sementes de crambe germinadas *in vitro* em meio MS $\frac{1}{2}$ forneceram segmentos apicais adequados ao processo de micropropagação. Na fase de indução de brotos, testando-se a interação das citocininas 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (CIN) e thidiazuron (TDZ) e diferentes concentrações, o maior número de brotos por explante foi obtido com 5 μ M de BAP aos 30 dias (9,26 brotos) e 15 μ M de BAP aos 60 dias (18,08 brotos) de cultivo *in vitro*. No alongamento com 1 μ M de ácido giberélico (GA $_3$), o comprimento médio dos brotos passou de 3,61 cm para 5,03 cm, após 30 dias. A maior porcentagem de enraizamento foi de 30% com 0,25 μ M de ácido naftaleno acético (ANA). Os resultados deste trabalho mostraram uma frequência satisfatória de regeneração de brotos a partir de segmentos apicais de crambe em meios contendo 5 μ M de BAP, e alongamento satisfatório com 1 μ M de GA $_3$. Contudo, existe a necessidade de enraizamento e aclimatização eficiente para completa propagação *in vitro* de crambe.

Palavras-chave: biodiesel, oleaginosas, regeneração *in vitro*, segmento apical, citocininas.

ABSTRACT**Micropropagation of *Crambe abyssinica* Hochst**

Crambe abyssinica Hochst. is a oilseed species that produces inedible oil, and, in Brazil, was initially used as a cover crop for soil and animal feed, but with the encouragement of production and use of renewable energy has emerged as an interesting alternative for the production of biodiesel. The objective of this study was to describe a protocol for micropropagation of crambe using as explants shoot tips. Crambe seeds germinated *in vitro* on MS½ medium supplied shoot tips suitable for the micropropagation. In the induction of shoots phase, testing the interaction of cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP), kinetin (KIN) and thidiazuron (TDZ) and different concentrations, the highest number of shoots per explant was obtained with 5 µM BAP at 30 days (9.26 shoots) and 15 µM BAP at 60 days (18.08 shoots) *in vitro* culture. Elongation with 1 µM of gibberellic acid (GA₃), the average length of shoots increased from 3.61 cm to 5.03 cm after 30 days. The highest rooting percentage was 30% with 0.25 µM of naphthalene acetic acid (NAA). The results of this study showed a satisfactory frequency of shoot regeneration from shoot tips of crambe in media containing 5 µM BAP and satisfying elongation with 1 µM GA₃. However, there is need for an efficient rooting and acclimatization for full *in vitro* propagation of crambe.

Key words: biodiesel, oilseeds, *in vitro* regeneration, shoot tips, cytokinins.

1- INTRODUÇÃO

Na busca por novas espécies de oleaginosas que produzam óleos não comestíveis para a produção de biodiesel, torna-se necessário empreender estudos com culturas pouco conhecidas que foram introduzidas mais recentemente no Brasil como *Crambe abyssinica* (Brassicaceae) (JASPER; BIAGGIONI; SILVA, 2010). Originário da Etiópia e domesticado na região do Mediterrâneo (KNIGHTS, 2002), essa espécie foi introduzida no Brasil no Estado do Mato Grosso do Sul (PITOL, 2008; DAHLKE; SIMONETTI, 2010). Inicialmente, foi utilizada como cultura para cobertura do solo e alimentação animal (30 a 32% de proteína bruta) (NEVES et al., 2010; BARROS et al., 2011), mas com o estímulo à produção e uso de energias renováveis, o crambe surgiu como alternativa interessante para a produção de biodiesel (WANG et al., 2000; ROSCOE; RICHETTI; MARANHO, 2007).

Outras vantagens do cultivo de crambe referem-se ao ciclo rápido (WANG; SONNTAG; RUDLOFF, 2003; CHHIKARA et al., 2012), alta produção de biomassa (ZULFIQAR et al., 2011), elevada quantidade de sementes (FALASCA et al., 2010), baixo custo de produção em relação a outras oleaginosas (JASPER; BIAGGIONI; SILVA, 2010), resistente a insetos (ANDERSON; PENG; WEISS, 1992; KMEC et al., 1998), percentual de óleo total na semente (32 a 38%), que supera o da soja (PAULOSE; KANDASAMY; DHANKHER, 2010; FALASCA et al., 2010), elevado percentual de ácido erúico no óleo extraído das sementes (50-60%), útil na indústria de plástico e lubrificante (PITOL, 2008; LI et al., 2010; PALMER; KELLER, 2011; LARA-FIOREZZA et al., 2013), além disso, a cultura tem potencial para fitorremediação contra metais pesados (ARTUS, 2006; PAULOSE; KANDASAMY; DHANKHER, 2010).

Há um grande interesse pelo melhoramento das espécies cultivadas a fim de aumentar a produtividade. Para tanto, a transformação genética e as técnicas de cultivo *in vitro* são importantes ferramentas a serem empregadas (VINTERHALTER et al., 2007; PAVLOVIC et al., 2012). Contudo, a transformação genética de plantas necessita de uma aplicação bem sucedida dessas técnicas, requerendo um sistema de propagação eficiente, viável, fiel geneticamente e que forneça material vegetal de qualidade para atender a essa demanda (SHUKLA; SAWHNEY, 1991; ISHIGAKI et al., 2009; MEMON et al., 2012).

Segundo Li et al. (2011), o desenvolvimento de um protocolo eficiente na regeneração de crambe cultivado *in vitro*, por intermédio das técnicas de cultura de tecidos, torna-se relevante para melhorar a qualidade e produção de óleo da espécie. A micropropagação é o melhor método disponível para a produção de plantas de alta qualidade que estão livres de

quaisquer doenças e pragas, contribuindo para a produção máxima potencial (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Deve-se destacar que essa metodologia pode ser utilizada para produzir um grande número de plantas que são geneticamente idênticas à planta progenitora (NAZ et al., 2011).

Para crambe, as técnicas de cultura de tecidos têm sido relatadas para regeneração *in vitro* (LI et al., 2010, 2011; PALMER; KELLER, 2011; CHHIKARA et al., 2012), produção de transgênicos (LI et al., 2010, 2013; CHHIKARA et al., 2012) e híbridos somáticos (WANG; LUO, 1998; WANG; SONNTAG; RUDLOFF, 2003; WANG et al., 2004, 2006), além da transferência de genes de interesse para outras espécies (MIETKIEWSKA et al., 2007).

Com relação à micropropagação, diferentes partes da planta têm sido utilizadas como explante, por exemplo, o hipocótilo (LI et al., 2010; 2011; PALMER; KELLER, 2011; CHHIKARA et al., 2012), cotilédones (PALMER; KELLER, 2011; CHHIKARA et al., 2012), raiz (PALMER; KELLER, 2011; CHHIKARA et al., 2012) e células em cultura (protoplastos) (GAO et al., 1998), sendo que apenas o protocolo desenvolvido por Li et al. (2011) obteve taxa de regeneração de brotos satisfatória de 95%. Embora uma grande quantidade de plantas geneticamente idênticas sejam regeneradas por meio da micropropagação, algumas variações somaclonais podem ser detectadas (MIGUEL; MARUM, 2011; PATHAK; DHAWAN, 2012), as quais por sua vez dependem de vários fatores, dentre estes, o tipo do explante utilizado deve ser considerado (CHUANG et al., 2009; LEELA et al., 2011).

O cultivo *in vitro* a partir de explantes com regiões meristemáticas, como segmentos apicais e nodais, são muito populares e importantes (SHARMA et al., 2011; ZOGHLAMI et al., 2012), pois, a frequência de variações somaclonais nas plântulas regeneradas é baixa (EL SAWY, 2007; DAS; KESARI; RANGAN, 2010; RAY; BHATTACHARYA, 2010; SINGH; RAI; SAHOO, 2012).

O objetivo deste trabalho foi descrever um protocolo para micropropagação de crambe utilizando como explante segmentos apicais.

2- MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo. Sementes de *Crambe abyssinica* Hochst da cultivar FMS brilhante, safra de 2011, obtidas com a Fundação MS, localizada em Maracaju, Mato Grosso do Sul-BR, foram utilizadas para o estabelecimento *in vitro* da cultura.

Fonte de explante

Segmentos apicais foram excisados de plântulas de crambe provenientes da germinação de sementes *in vitro*. As sementes foram inicialmente lavadas em água corrente com detergente neutro, e em condições assépticas na câmara de fluxo laminar foram desinfestadas por imersão em solução de antibiótico Penicilina (10 mg L⁻¹) e Rifampicina (10 mg L⁻¹) por 30 minutos (min), álcool 70% por 1 min, seguido de hipoclorito de sódio comercial 50% (cloro ativo: 2-2,5%) por 30 min, e lavadas três vezes em água destilada autoclavada.

Meio de cultura e condições de cultivo

Na germinação *in vitro* das sementes de crambe o meio de cultura utilizado foi o MS½ (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Após 30 dias, segmentos apicais com tamanho aproximadamente de 2-3 cm foram obtidos e utilizados no processo de micropropagação.

Na indução de brotos, os explantes foram inoculados em meio MS testando-se as citocininas 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (CIN) e thidiazuron (TDZ) em diferentes níveis (0,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 µM). O subcultivo foi realizado aos 30 dias e as avaliações no tempo 30 e 60 dias após a inoculação.

Para o alongamento, as plântulas regeneradas a partir dos tratamentos com BAP, TDZ e seus níveis, foram selecionadas e transferidas para o meio MS com 1 µM ácido giberélico (GA₃), sendo avaliadas após 30 dias (tempo 90 dias).

Para o enraizamento, as plântulas provenientes dos tratamentos com 5 µM BAP e 5 µM TDZ foram transferidas para meio MS contendo ANA (ácido 1-naftalenoacético) ou AIA (ácido 3-indolacético), nas concentrações de 0,0; 0,25 e 0,50 µM. As avaliações ocorreram após 30 dias nos meios de enraizamento descritos (tempo 120 dias).

Os meios foram suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,5 mg L⁻¹ de nitrato de prata (AgNO₃) (LI et al., 2010) e 7 g L⁻¹ de ágar. Tiveram o pH ajustado para 5,8, vertidos em tubos de ensaio de 25x150 mm (10 ml) e autoclavados a 1,1 atm, 121 °C, por 20 minutos. Todas as culturas foram incubadas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro), sob lâmpadas fluorescentes fornecendo 25,2 μmol m⁻² s⁻¹ de fluxos de fótons fotossintéticos, e temperatura de 25±1 °C.

Aclimatização das plantas regeneradas

As plantas com aproximadamente 11 cm e com parte aérea e raiz bem desenvolvida, proveniente dos tratamentos de enraizamento, foram utilizadas para a aclimatização. Ainda na sala de crescimento, em intervalos de sete dias, foram efetuados os seguintes procedimentos: (1) as tampas dos tubos de ensaio foram substituídas por filme de polivinilcloreto (PVC); (2) realizados furos no filme PVC; e (3) o filme foi retirado por completo. Após esse período de 21 dias, as plantas foram retiradas dos tubos, lavadas as raízes em água corrente para remover o excesso do meio de cultura, transferidas individualmente para copos plásticos foscos (contendo substrato comercial (Vivato Slim[®]) ou latossolo vermelho-amarelo distrófico corrigido, ambos autoclavados. Nesse estágio, foram nutridas com solução de macro e micronutrientes do meio MS e mantidas em local com luz e temperatura ambiente.

Avaliações morfológicas

As avaliações fitotécnicas foram realizadas nas diferentes fases da micropropagação nos tempos 30 e 60 (indução de brotos), 90 (alongamento) e 120 dias (enraizamento), quanto ao número de brotos por explante (NBE), comprimento médio dos brotos (CMB), utilizando paquímetro digital, massa fresca total (MF), por meio da pesagem em balança de precisão, porcentagem de enraizamento (%Enraiz.) e porcentagem de sobrevivência (%Sobrev.).

Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi instalado em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC). Na indução de brotos, o efeito da interação entre as citocininas e seus níveis foi conduzido em esquema fatorial 3x5, tendo no fator citocinina três tipos (BAP, CIN e TDZ) e em cinco níveis (0, 5, 10, 15 e 20 μM).

Na fase de alongamento com 1 μM de GA_3 , empregou-se o esquema fatorial 2x5 (citocinina x níveis), utilizando as plântulas provenientes dos tratamentos com BAP, TDZ e seus níveis.

O enraizamento também foi conduzido em esquema fatorial 2x5, com duas citocininas (5 μM BAP e 5 μM TDZ), e cinco tratamentos para o enraizamento, controle (0,0 μM), 0,25 e 0,50 μM de ANA, e 0,25 e 0,50 μM de AIA. Foram cinco o número de repetições, sendo a repetição constituída por 10 tubos de ensaio com um explante cada. Os dados de porcentagem de enraizamento (%Enraiz.) foram transformados por $[(x/100)+1]$.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, depois de verificadas a normalidade e homogeneidade. Quando verificada a significância nas interações ou nos fatores, foi aplicado o teste de média de Tukey nos fatores qualitativos, adotando-se 1 e 5% de probabilidade pelo software Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2009). Para o fator quantitativo (níveis), foi efetuada análise de regressão com o software Sigma Plot 10.0 (2006), sendo representado apenas com base na significância dos coeficientes de regressão e coeficiente de determinação (R^2), adotando-se os níveis até 5% de probabilidade, utilizando-se o teste F, levando-se também em consideração o fenômeno biológico em estudo.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes de crambe germinadas *in vitro* desenvolveram plantas saldáveis e apropriadas (Figura 1A) como fonte de segmentos apicais a serem utilizados como explante (Figura 1B), e estes se estabeleceram e se desenvolveram adequadamente *in vitro* (Figura 1C-E). Em geral, os resultados evidenciaram que as citocininas utilizadas promoveram a multiplicação dos brotos a partir de segmentos apicais de crambe de forma eficiente e satisfatória. O meio MS sem citocininas (0 μM) produziu numerosas raízes aos 30 dias e a dominância apical não foi afetada, mas aos 60 dias notou-se senescência e morte da maioria das plântulas (dados não apresentados). Os mesmos resultados foram relatados para segmentos apicais de *Raphanus sativus* var. *radicula* (PAVLOVIC et al., 2012). Isso demonstra a importância das citocininas na supressão da dominância apical, resultando em amplo desenvolvimento de novos brotos e inibição do surgimento de raiz.

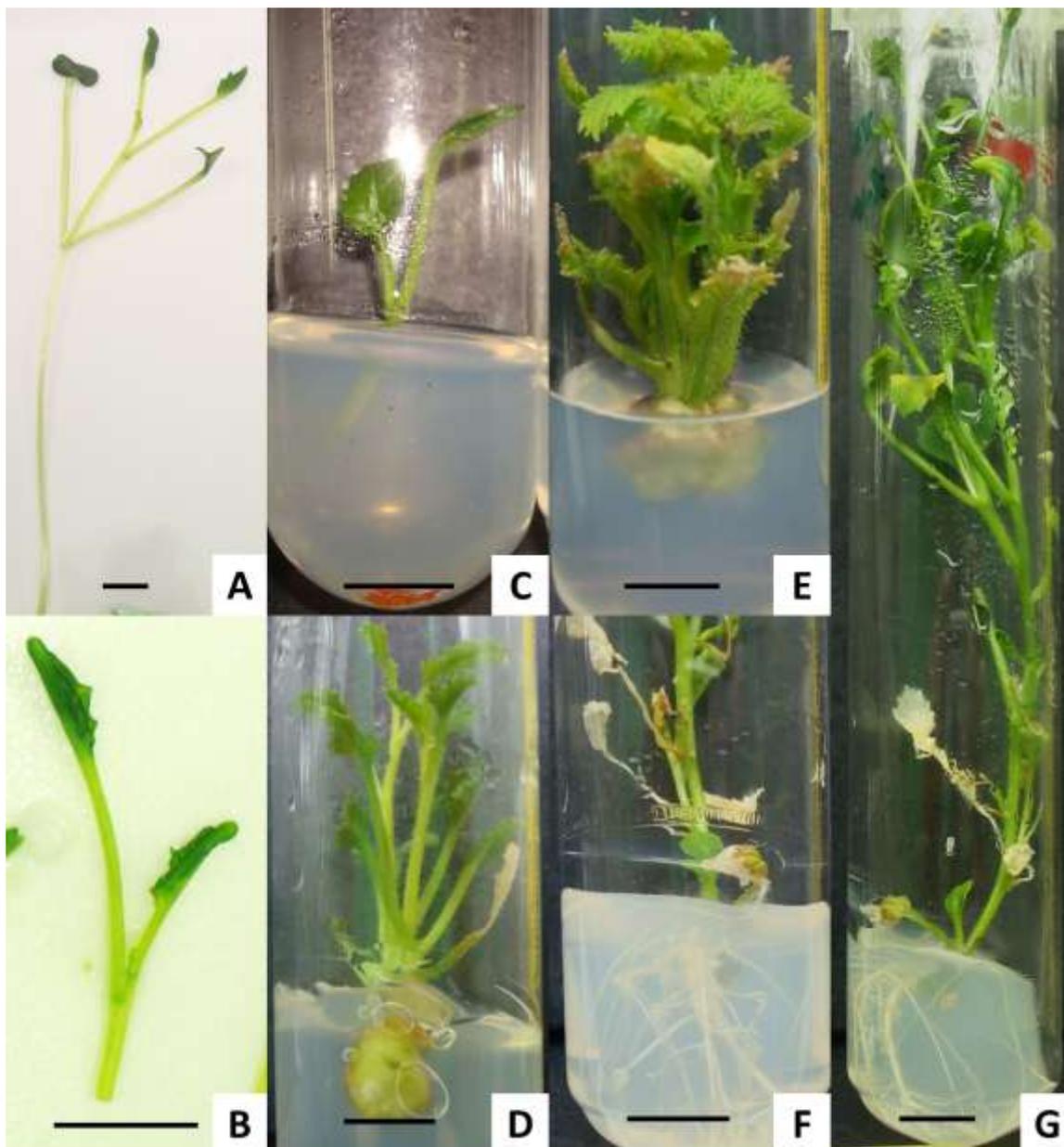


Figura 1 – Regeneração de *C. abyssinica* através de segmentos apicais. (A) Planta germinada *in vitro*; (B e C) Segmento apical utilizado como explante (0 dias); (D e E) Brotos induzidos com 5,0 μM BAP aos 30 e 60 dias, respectivamente; (F e G) Enraizamento de brotos com 0,5 μM ANA aos 120 dias. Barra = 1,0 cm.

Na fase de indução de brotos, a análise de variância indicou que houve interação significativa entre as citocininas (BAP, CIN e TDZ) e os níveis (0; 5; 10; 15 e 20 μM) apenas para as variáveis número de brotos por explante (NBE) e massa fresca total (MF) aos 60 dias, e no comprimento médio de brotos (CMB) em ambas as avaliações. Isso sugere a existência de resposta diferenciada na multiplicação de brotos em relação às dosagens de cada citocinina após um maior período de contato com o explante (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância para número de brotos por explante (NBE), comprimento médio dos brotos (CMB), massa fresca total (MF) e porcentagem de sobrevivência (% Sobrev.) de plântulas de *C. abyssinica* sob interação de diferentes níveis de BAP, CIN e TDZ após 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*

FV	GL	Teste F							
		NBE		CMB		MF		%Sobrev.	
		30d.	60d.	30d.	60d.	30d.	60d.	30d.	60d.
Citocinina (A)	2	5,05**	56,42**	18,24**	29,65**	8,65**	16,48**	0,71 ^{ns}	1,50 ^{ns}
Concentração	4	18,79 ⁻	32,15 ⁻	3,10 ⁻	0,58 ⁻	14,68 ⁻	23,47 ⁻	1,52 ⁻	30,71 ⁻
Int. A x B	8	1,20 ^{ns}	6,46**	2,26*	2,23*	0,97 ^{ns}	3,44**	0,37 ^{ns}	1,10 ^{ns}
Resíduo	60	-	-	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	8,69	12,98	4,08	3,61	0,36	0,31	96,95	91,72
CV (%)	-	13,41	12,11	8,50	14,64	37,63	34,13	6,58	6,46

** , * significativos a 0,01 e 0,05 de probabilidade, respectivamente;

ns: não significativo;

CV(%): coeficiente de variação em porcentagem.

Para o NBE, aos 30 dias, a análise de variância mostrou que apenas os tipos de citocininas foram significativos (Tabela 1), e que dentre as citocininas testadas, a BAP obteve o maior valor (9,26 brotos), embora não tenha diferido significativamente do TDZ (8,23 brotos) (Tabela 2). Aos 60 dias, a interação significativa entre os fatores demonstrou que em todos os níveis testados, a BAP apresentou valores superiores às demais com diferença significativa, sendo que na concentração de 15 μ M foi detectado o maior valor para NBE (18,08 brotos) (Tabela 3). Nos dois tempos de avaliação, o TDZ foi mais eficiente que a CIN para indução de brotos na maioria dos níveis, diferenciando estatisticamente apenas aos 60 dias a 5 μ M (Tabela 2 e 3). Importante ressaltar que houve um incremento considerável de NBE dos 30 dias (média geral: 8,69) para os 60 dias (média geral: 12,98), indicando que até esse período as citocininas agiram de forma regular.

Tabela 2. Média do número de brotos por explante (NBE) de plântulas de *C. abyssinica* sob diferentes citocininas após 30 dias de cultivo *in vitro*

Citocininas	Médias
BAP	9,26 a
CIN	8,23 b
TDZ	8,58 ab

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Tabela 3. Média do número de brotos por explante (NBE) de plântulas de *C. abyssinica* sob interação de diferentes citocininas e níveis após 60 dias de cultivo *in vitro*

Citocininas	Concentração (μM)				
	0	5	10	15	20
BAP	8,87 a	16,77 a	17,28 a	18,08 a	16,97 a
CIN	8,87 a	10,16 b	11,50 b	11,30 b	13,14 b
TDZ	8,87 a	15,29 a	13,21 b	11,95 b	12,49 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

A análise de regressão dos níveis das citocininas pelo NBE aos 30 e 60 dias está apresentada na Figura 2. Pode-se verificar que a resposta foi quadrática, exceto para a CIN aos 60 dias, que foi linear positiva. Pela equação de regressão da BAP, aos 30 dias, com uma concentração de 12,23 μM seria possível obter valor máximo de 10,62 brotos, e aos 60 dias, 13,46 μM poderia chegar a um resultado de 18,74 brotos.

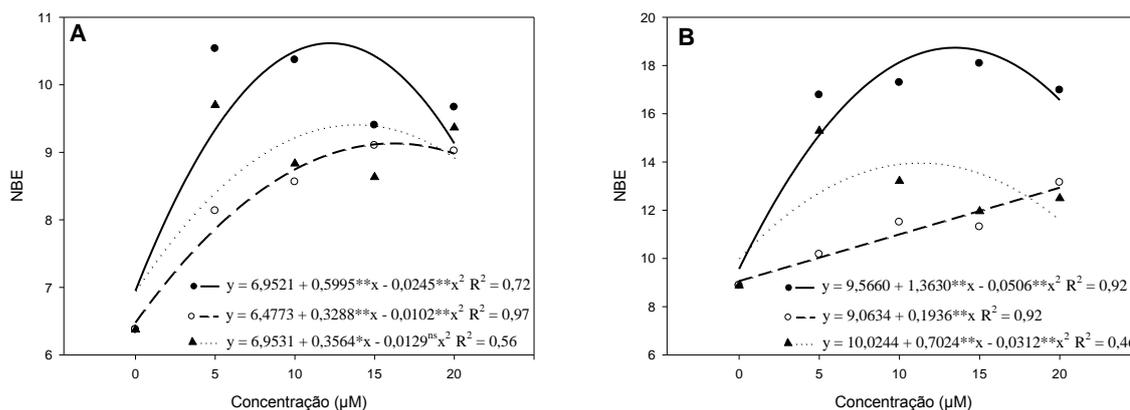


Figura 2 – Regressão polinomial dos valores médios do número de brotos por explante (NBE) de plântulas de *C. abyssinica* submetidas a diferentes níveis de citocininas após 30 dias (A) e 60 dias (B) de cultivo *in vitro*. (●-BAP; ○-CIN; ▲-TDZ).

A BAP é uma das citocininas de menor custo e têm sido muito eficaz na multiplicação de diversas espécies de brassicaceae (SHUKLA; SAWHNEY, 1991; MEMON et al., 2009; ISHIGAKI et al., 2009). Estudos relacionados à indução de brotos e regeneração de plantas inteiras a partir de segmento apical ainda não foram descritos para crambe, contudo, protocolos anteriormente publicados para a regeneração *in vitro* foram obtidos por intermédio da utilização de hipocótilos como explante, viabilizando estudos relacionados ao melhoramento genético da espécie como a transgenia e a hibridização somática (WANG; LUO, 1998; WANG; SONNTAG; RUDLOFF, 2003; WANG et al., 2004).

Li et al. (2010), trabalhando com hipocótilos como explantes, descreveram um protocolo de indução direta de brotos em meio MS suplementado com 10 µM de TDZ e 2,7 µM de ANA, promovendo uma frequência de regeneração de até 60% para *C. abyssinica* cv. Galactica. Em um novo trabalho, Li et al. (2011) obtiveram 95% de regeneração de brotos utilizando o meio Lepiovre suplementado também com 10 µM de TDZ, 2,7 µM ANA. Chhikara et al. (2012) notaram eficiência na regeneração no meio MS com 8,8 µM de BAP e 0,10 µM de ANA com uma frequência de 70%, a partir de calos do hipocótilo. Neste trabalho, apesar de ter utilizado um explante diferente dos trabalhos acima relatados, os níveis das citocininas utilizadas foram próximas, e promoveram em ambos de forma eficiente a resposta morfogenética esperada tanto com BAP quanto com TDZ.

Recentes trabalhos com brassicaceae têm relatado maior eficiência do BAP comparado com a CIN. Pavlovic et al. (2012), em seu trabalho com diferentes genótipos de *Brassica oleracea* var. Capitata L., relataram que os meios suplementados com BAP (8,88 µM) obtiveram valor máximo de 10,06 brotos a partir de gemas laterais, e segundo esses autores

em todos os genótipos testados o menor índice de multiplicação foi observada em meios suplementados com CIN. Memon et al. (2009) observaram que a maior taxa de proliferação de brotos em segmentos foliares (45 brotos/explante) pode ser alcançada para *B. campestris* ssp. *Chinensis* em meio MS suplementado com 8,88 μM de BAP. Alta frequência de brotos (100%), a partir de hipocótilos de *B. carinata* foi também conseguida (YANG; JIA; PUA, 1991). A presença de BAP aumentou significativamente o número de brotos por explante em *B. oleracea* (CHENG; LAKSHMANAN; SWARUP, 2001). A concentração ideal para a regeneração de brotos em *B. juncea* foi de 4,44 μM de BAP (GUO et al., 2005). Todos esses resultados acima corroboram o fato de que, assim como para as espécies de brassicaceae citadas, para crambe o valor de 5,0 a 10 μM de BAP é o ideal para promover a regeneração *in vitro* de brotos, e que esse regulador nessas concentrações tem sido um dos mais utilizados para essa família.

Para o CMB, a interação entre as citocininas e seus níveis foi significativa aos 30 e 60 dias (Tabela 1). Ao analisar os resultados aos 30 dias, as médias mais elevadas para o comprimento foram obtidas nos tratamentos contendo 15 e 20 μM de TDZ, com 4,50 e 4,66 cm, respectivamente, não diferindo da CIN (Tabela 4). Em todos os níveis testados, o BAP apresentou aos 30 dias os menores valores para essa variável. Aos 60 dias, o TDZ manteve a tendência de induzir maior comprimento em todos os níveis testados, em que o maior valor foi com 5 μM (4,32 cm), e nesta avaliação sem diferenciar do BAP (Tabela 5). A CIN demonstrou os menores valores em todos os níveis testados aos 60 dias.

Tabela 4. Comprimento médio dos brotos (CMB) (cm) de plântulas de *C. abyssinica* sob interação de diferentes citocininas e níveis após 30 dias de cultivo *in vitro*

Citocininas	Concentração (μM)				
	0	5	10	15	20
BAP	3,94 a	3,72 a	3,50 b	3,60 b	3,96 b
CIN	3,94 a	4,20 a	4,45 a	3,95 b	4,41 ab
TDZ	3,94 a	4,11 a	4,32 a	4,50 a	4,66 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Tabela 5. Comprimento médio dos brotos (CMB) (cm) de plântulas de *C. abyssinica* sob interação de diferentes citocininas e níveis após 60 dias de cultivo *in vitro*

Citocininas	Concentração (µM)				
	0	5	10	15	20
BAP	3,54 a	4,18 a	4,10 a	3,72 a	3,94 a
CIN	3,54 a	2,59 b	2,91 b	2,77 b	2,93 b
TDZ	3,54 a	4,32 a	4,15 a	3,93 a	4,01 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Analisando a curva de regressão para CMB de crambe em relação aos níveis de citocininas (Figura 3), aos 30 dias o efeito dos níveis de TDZ foi linear, e aos 60 dias foi quadrática, com possibilidade de atingir 4,20 cm na concentração de 11,26 µM, segundo a equação de regressão.

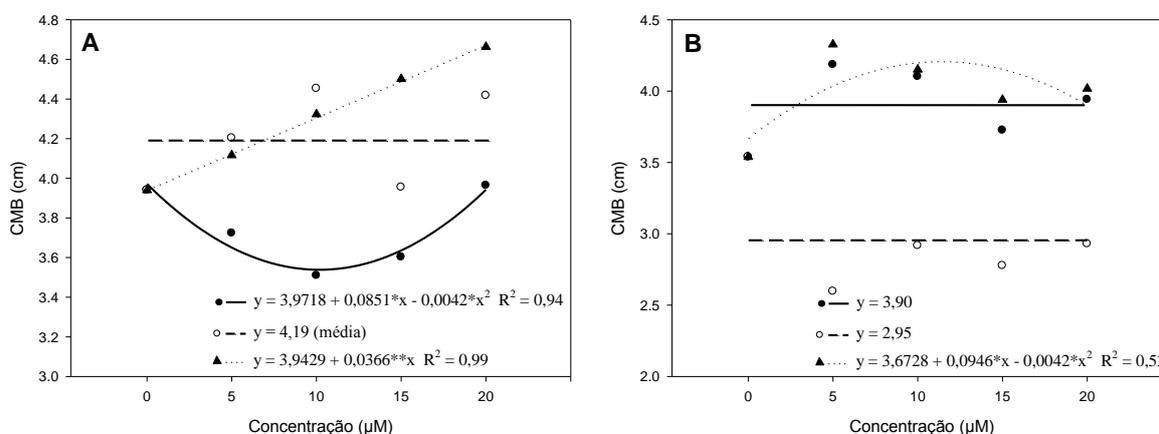


Figura 3 – Regressão polinomial dos valores de comprimento médio dos brotos (CMB) de plântulas de *C. abyssinica* submetidas a diferentes níveis de citocininas após 30 dias (A) e 60 dias (B) de cultivo *in vitro*. (●-BAP; ○-CIN; ▲-TDZ).

O menor comprimento dos brotos das plantas de crambe submetidas às concentrações de BAP aos 30 dias pode ser explicado pela eficiente indução no número de brotos causada por este regulador, ou seja, pela quebra da dominância apical (BRUM; SILVA; PASQUAL, 2002). Segundo Radmann et al. (2011), nessa fase da cultura, a quebra da dominância apical é necessária para induzir a proliferação do maior número de brotos possível, e esse efeito causa diminuição no comprimento da parte aérea. Com o aumento das concentrações e do tempo de

exposição às citocininas, houve de forma geral diminuição no comprimento dos brotos. Esses resultados concordam com autores que sugerem que esse regulador de crescimento não é responsável pelo alongamento de brotos (PAIVA et al., 1997; PASQUAL et al., 2002; VILLA et al., 2005; TAIZ; ZEIGER, 2006).

Os menores valores de multiplicação e alongamento de brotos de crambe *in vitro* aos 60 dias em meio com CIN pode ser explicado pela maior ação da enzima citocinina-oxidase (PERES; KERBAUY, 2004), que degrada esse regulador por ser de origem natural e com isso altera o equilíbrio hormonal no que se refere ao balanço auxina/citocinina (MONFORT et al., 2012). Provavelmente isso não aconteceu com BAP e TDZ por serem sintéticas.

Paiva et al. (1997), trabalhando com gloxínia (Gesneriaceae), observaram também uma redução do tamanho de brotos com o aumento das concentrações de BAP. Alguns autores têm constatado os mesmos resultados negativos desse regulador de crescimento no alongamento das brotações em espécies como crisântemo (Asteraceae) e morangueiro (Rosaceae) (PASQUAL et al., 2002).

Erig, Gerson e Fortes (2002), em pesquisas com amoreira preta (Moraceae), relataram que o aumento nos níveis de BAP resultou na diminuição do comprimento médio das brotações. Rubin et al. (2006) evidenciaram que a presença de BAP provocou uma diminuição no alongamento da parte aérea de *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae).

As citocininas utilizadas durante a fase de propagação *in vitro*, quase sempre, promovem formação de partes aéreas, mas seu excesso pode ser tóxico e levar ao encurtamento dos entrenós (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Conforme Taiz e Zeiger (2006), a interação entre as citocininas e as auxinas endógenas é necessária para o crescimento da parte aérea, com promoção da divisão e alongamento celular. Porém, segundo os mesmos autores, o tecido pode apresentar autonomia na síntese de auxinas e citocininas, podendo a aplicação exógena gerar um desbalanço interno entre esses fitorreguladores ocasionando efeito tóxico sobre a formação e crescimento dos mesmos.

Com relação à massa fresca total (MF), houve significância entre as citocininas aos 30 dias, e, interação entre os fatores aos 60 dias (Tabela 1). A Tabela 6 mostra que aos 30 dias, os tratamentos com CIN obtiveram maior valor de MF (0,4470 g), diferindo estatisticamente do TDZ (0,3448 g) e da BAP (0,2897 g). Aos 60 dias, houve uma inversão nessa variável, em que a BAP apresentou a maior massa em todos os níveis, sendo que em 15 e 20 μ M ocorreram os valores mais elevados, 0,4881 e 0,5866 g, respectivamente (Tabela 7). Comparando-se os valores médios gerais aos 30 e 60 dias a massa fresca decresceu ligeiramente, de 0,36 para 0,31 g, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 6. Massa fresca total (MF) (g) de plântulas de *C. abyssinica* sob diferentes citocininas após 30 dias de cultivo *in vitro*

Citocininas	Médias (g)
BAP	0,2897 b
CIN	0,4470 a
TDZ	0,3448 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Tabela 7. Massa fresca total (MF) (g) de plântulas de *C. abyssinica* sob interação de diferentes citocininas e níveis após 60 dias de cultivo *in vitro*.

Citocininas	Concentração (μM)				
	0	5	10	15	20
BAP	0,0768 a	0,4823 a	0,4437 a	0,4881 a	0,5866 a
CIN	0,0768 a	0,2244 b	0,3307 a	0,2773 b	0,3969 b
TDZ	0,0768 a	0,4263 a	0,3252 a	0,2860 b	0,2244 c

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

A análise de regressão para massa fresca demonstrou que, aos 30 dias, a CIN apresentou os maiores valores, que foram ajustados a um modelo quadrático, em que normalmente ocorre uma subsequente redução à medida que se aumenta a concentração desses reguladores. Isso ocorreu após a concentração de 15,61 μM . Aos 60 dias a CIN apresentou modelo linear, ou seja, resposta diretamente proporcional entre massa fresca e as concentrações. O TDZ, aos 30 e 60 dias, deu valores intermediários e comportamento quadrático. Segundo o modelo ajustado para a BAP, aos 30 dias, demonstrou comportamento linear com os menores valores para esta variável, e, aos 60 dias, promoveu maior massa fresca com resposta quadrática, com possível redução a partir da concentração de 16,96 μM (Figura 4B).

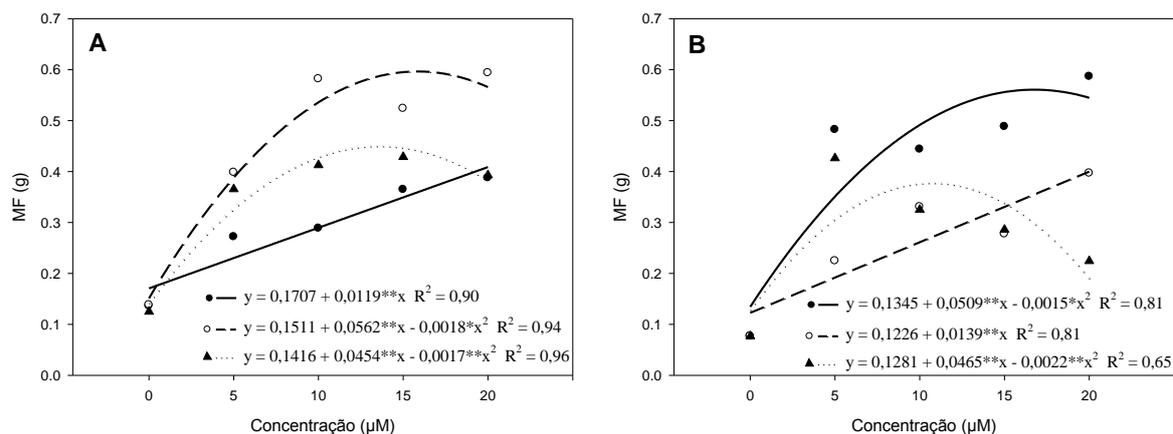


Figura 4 – Regressão polinomial dos valores de massa fresca total (MF) de plântulas de *C. abyssinica* submetidas a diferentes níveis de citocininas após 30 dias (A) e 60 dias (B) de cultivo *in vitro*. (●-BAP; ○-CIN; ▲-TDZ).

Aos 30 dias, as plântulas com CIN apresentaram aspecto morfológico vitrificado com grandes folhas anormais (dados não apresentados), o que possivelmente foi a causa de sua maior massa fresca comparado com as demais. A suplementação dos meios de cultura com CIN em concentração elevada influenciou também os valores da variável massa fresca em segmentos nodais de *Gypsophila paniculata* (Caryophyllaceae) (QUOIRIN et al., 2008), uma vez que o excesso desse regulador promove uma série de eventos nos explantes como a regeneração de brotações anormais e hiperhídricas (HAN; PAEK; CHOI, 1992).

Lopes et al. (2012) notaram que no tratamento das plantas com CIN houve produção maior em número de folhas diferenciadas, aumento da área foliar e consequentemente da massa fresca. Taiz e Zeiger (2006) observaram que, em folhas isoladas e tratadas com CIN, ocorre impedimento da ação das proteases e RNases foliares, promotoras da senescência. Em decorrência disso, as plântulas possuem mais folhas e consequentemente maior massa. Segundo Conceição, Lopes e Fortes (2004), a variação na produção de massa está associada, principalmente, à variação na área foliar.

O observado alinha-se ao descrito por Caldas, Haridasan e Ferreira (1998), que descreveram as diferenças entre as atuações das citocininas, em que o BAP induz alta taxa de multiplicação de brotações em muitos sistemas de micropropagação, enquanto a CIN permite apenas o crescimento normal sem muitas brotações adventícias múltiplas. Os resultados aos 30 dias para massa fresca corrobora com os encontrados por Paek, Chandler e Thorpe (1987), em que BAP induziu maior NBE e a CIN maior MF para *Raphanus sativus* L. var. *longipinnatus* (Brassicaceae).

Aos 60 dias nos meios com BAP, ocorreram os maiores valores de massa fresca devido ao maior incremento no número de brotos. A queda nos valores de massa fresca com CIN pode ser explicada pela sua degradação enzimática, explicada para CMB. A subsequente redução da massa fresca, à medida que se aumentou a concentração de BAP, provavelmente tenha ocorrido devido a um desbalanço na relação auxina/citocinina. Comportamento semelhante ao encontrado por Dutra et al. (2004), em trabalhos de multiplicação *in vitro* de oliveira (*Olea europaea* L.), em que à medida que se aumentou a concentração de BAP, houve aumento da massa fresca seguido de redução nessa variável a partir de certa concentração.

Os brotos de crambe que apresentaram melhor aspecto morfológico e desenvolvimento na fase de indução de brotos regenerados a partir das concentrações de BAP e TDZ, além do controle, foram selecionados para a fase de alongamento. Todos esses brotos provenientes desses tratamentos foram transferidos para meio MS suplementado com uma única concentração de 1 μM de GA_3 , e permaneceram nessas condições por 30 dias. A análise de variância nessa fase demonstrou não haver interação significativa entre as citocininas e os níveis para o CMB (Tabela 8), indicando que a influência do GA_3 no alongamento dos brotos foi independente das citocininas e níveis aplicados anteriormente na fase de indução de brotos. Além disso, essa reposta no alongamento pode ser constatada comparando-se o valor médio geral anterior, que foi de 3,61 cm aos 60 dias (Tabela 1), e após 30 dias na presença de GA_3 no meio obteve-se um CMB geral de 5,03 cm (Tabela 8).

Tabela 8. Resumo da análise de variância para comprimento médio dos brotos (CMB) (cm) e porcentagem de sobrevivência (%Sobrev.) de plântulas de *C. abyssinica*, provenientes dos tratamentos com BAP e TDZ, submetidas ao alongamento 1 μM de GA_3 aos 90 dias de cultivo *in vitro*

FV	GL	Teste F	
		CMB	%Sobrev.
Citocinina (A)	1	1,23 ^{ns}	0,18 ^{ns}
Concentração (B)	4	8,81 ^{**}	5,02 ^{**}
Int. A x B	4	0,37 ^{ns}	1,80 ^{ns}
Resíduo	40	-	-
Média Geral	-	5,03	90,68
CV (%)	-	12,67	6,90

** , * significativos a 0,01 e 0,05 de probabilidade, respectivamente;
 ns: não significativo;
 CV(%): coeficiente de variação em porcentagem.

O GA_3 adicionado ao meio de cultura pode promover aumento no comprimento dos brotos devido ao estímulo da divisão e alongamento das células (ROCHA et al., 2009; MOURA et al., 2012). A incorporação de 1 μM GA_3 produziu brotos com comprimento médio geral considerado adequado para realizar as etapas seguintes da micropropagação, que são o enraizamento e posteriormente a aclimatização das plantas. Brotos com pequeno comprimento poderão apresentar baixo percentual de enraizamento se estes forem diretamente cultivados em meios de enraizamento, ou irão originar mudas de baixa qualidade para a fase de aclimatização (ROCHA et al., 2009).

Purkayastha et al. (2010) relataram que 0,5 μM de GA_3 aumentaram em três vezes o alongamento em 98% das culturas. O alongamento de brotos atrofiados, gerados em meio contendo citocininas por tempo e concentrações elevadas, é dependente da redução ou ausência das citocininas ou a incorporação de GA_3 ao meio (PAUL et al., 2010). Esse efeito do GA_3 com relação a BAP foi relatado em outras espécies de plantas (JORDAN; OYANEDEL, 1992; PUROHIT; SINGHVI, 1998; SUGLA et al., 2007; PURKAYASTHA et al., 2008). Chhikara et al. (2012) relataram que para induzir o desenvolvimento das raízes adventícias em crambe *in vitro* deve-se incorporar GA_3 ao meio.

De acordo com Purkayastha et al. (2010), o cultivo prolongado em meio contendo esse regulador produz plântulas finas e alongadas excessivamente, inadequadas para o

enraizamento. Isso pode explicar também a baixa porcentagem de enraizamento obtida no presente trabalho.

Diferente do relatado para crambe, Moura et al. (2012) notaram que não houve diferença significativa no alongamento de segmentos nodais, provenientes da combinação de 2,6 μM de BAP e 0,16 μM de ANA, com diferentes concentrações de GA_3 , e que não foi alcançado comprimento de forma satisfatória (0,64 cm). Outros autores também não observaram efeito do GA_3 no alongamento *in vitro* em plântulas provenientes da fase de indução de brotos com citocininas (VILLA et al., 2008; SILVA et al., 2011).

Os brotos alongados provenientes dos tratamentos 5 μM de BAP e 5 μM de TDZ foram transferidos para meios de indução de raízes com ANA e AIA. Após 30 dias nessas condições, os brotos responderam a esse estímulo (Figura 1F e G). No entanto, houve um baixo rendimento nesses tratamentos empregados, obtendo-se uma média geral de 13,66% de enraizamento. A análise de variância para a interação das concentrações de ANA e AIA (Tabela 9) não demonstrou significância para a %Enraiz. Numericamente, a maior porcentagem de enraizamento foi de 30% detectada no tratamento com 0,25 μM ANA nas plântulas provenientes de 5 μM BAP (dados não apresentados). Os resultados da análise de variância indicaram diferença apenas nas citocininas testadas, em que plântulas provenientes de 5 μM BAP apresentaram média geral maior de 20,66% de enraizamento, comparado com 6,66% quando submetido a 5 μM TDZ (Tabela 10).

Tabela 9. Resumo da análise de variância para porcentagem de enraizamento (%Enraiz.) e porcentagem de sobrevivência (%Sobrev.) de plântulas de *C. abyssinica*, provenientes dos tratamentos com BAP e TDZ a 5 µM, submetidas ao enraizamento com ANA e AIA, nas concentrações de 0,0; 0,25 e 0,50 µM aos 120 dias de cultivo *in vitro*

FV	GL	Teste F	
		%Enraiz.	%Sobrev.
Citocinina (A)	1	7,53**	0,94 ^{ns}
Auxina (B)	4	1,76 ^{ns}	1,04 ^{ns}
Int. A x B	4	1,17 ^{ns}	1,60 ^{ns}
Resíduo	40	-	-
Média Geral	-	13,66	88,00
CV (%)	-	15,86	22,09

** , * significativos a 0,01 e 0,05 de probabilidade, respectivamente;
 ns: não significativo;
 CV(%): coeficiente de variação em porcentagem.

Tabela 10. Porcentagem de enraizamento (%Enraiz.) de plântulas de *C. abyssinica*, provenientes dos tratamentos com BAP e TDZ a 5 µM, submetidas ao enraizamento com ANA e AIA, nas concentrações de 0,0; 0,25 e 0,50 µM aos 120 dias de cultivo *in vitro*

Citocininas	%Enraiz.
BAP	20,66 a
TDZ	6,66 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste F, a 5%.

Os fenômenos envolvidos no enraizamento são difíceis de serem identificados, em decorrência de sua complexidade, sendo assim um entrave para o conhecimento adequado dessa etapa (ASSIS; TEIXEIRA, 1998). O baixo enraizamento encontrado para crambe pode estar relacionado aos efeitos residuais das citocininas e da giberelina inseridas nas fases anteriores. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), a adição de giberelina ao meio é desnecessária e pode ser prejudicial ao enraizamento, enquanto que a adição de citocininas ao meio pode provocar inibição do enraizamento (GRIMALDI et al., 2008). Foi constatado que explantes de espécies com dificuldade para enraizar possuem um alto nível de citocinina

endógena, enquanto que espécies com facilidade para enraizar possuem baixos níveis (HARTMANN; KESTER; DAVIES, 1990).

A capacidade de produzir raízes e brotos depende da proporção citocinina/auxina no meio de cultivo (SHUKLA; SAWHNEY, 1991). Um valor mais alto dessa relação favorece a formação de brotos, enquanto um valor mais baixo favorece a formação de raízes (SKOOG; MILLER, 1957; ROUT; SAMANTARAY; DAS, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2006; ROUT; MOHAPATRA; JAIN, 2006), e os efeitos residuais devem ser levados em consideração. A grande dificuldade é mensurar o resíduo dos reguladores de crescimento durante as fases da micropropagação. De acordo com Flores et al. (2009), uma alternativa para minimizar esse problema é a transferência dos brotos para um meio nutritivo isento de reguladores de crescimento.

Em questão ao maior efeito inibitório relatado para o TDZ na regeneração de raízes de crambe, foi também descrito para outras espécies (KHAWAR et al., 2004; FLORES et al., 2007). Explicados pelo fato do TDZ alterar o metabolismo de citocininas naturais, culminado no aumento do teor endógeno de citocinina (MOK et al., 1987, apud FLORES et al., 2009).

Alguns trabalhos relatam enraizamento de brotos de crambe a partir de hipocótilos utilizados como explante. Li et al. (2010) conseguiram 59 e 67% enraizamento com 0,54 e 0,27 μM ANA, respectivamente, em brotos provenientes do tratamento com 10 μM de TDZ e 2,7 μM ANA. Esses autores ainda relatam que 0,49 μM e 0,25 μM de AIB tinham frequências baixas de enraizamento de 24 e 18%, respectivamente. Já Chhikara et al. (2012) induziram raiz com 9,5 μM de AIB, em brotos induzidos a partir de 8,88 μM de BAP e 0,10 μM de ANA, mas não revelaram a eficiência desse tratamento. Wang e Luo (1998) conseguiram enraizamento satisfatório em brotos de crambe gerados a partir de ovário imaturo após 15 dias com meio $\text{MS}\frac{1}{2}$ + 0,28 μM AIB.

Em outras espécies de brassicaceae, concentrações mais elevadas de auxinas foram utilizadas para o enraizamento de brotos com resultados superiores ao observado para crambe. Memon et al. (2009) observaram que em *Brassica campestris* ssp. *chinensis* com 2,7 μM de ANA obtiveram 54,4% de raízes formadas e que, com 1,6 μM o enraizamento foi de 88,8%. Shukla e Sawhney (1991) notaram que 5 μM ANA estimula o enraizamento em sua resposta máxima para *B. napus*.

Talvez, o longo tempo de cultivo e os resíduos de reguladores de crescimento tornaram o enraizamento baixo no presente trabalho. O sucesso do enraizamento dos explantes é pré-requisito para qualquer protocolo de micropropagação, pois é importante para facilitar o estabelecimento da planta no processo de aclimatização (PATI et al., 2006).

A porcentagem de sobrevivência (%Sobrev.) foi elevada em todas as fases da micropropagação durante o desenvolvimento *in vitro* (Tabela 1, 8 e 9). Decaindo levemente com o passar das fases, obtendo inicialmente 96,95% (30 dias) e antes da aclimatização 88,00% (120 dias) de sobrevivência. Portanto, todos os tratamentos empregados e tempos de avaliação deram taxas de sobrevivência satisfatórias, sem diferenciar estatisticamente.

Na aclimatização, a taxa de sobrevivência durante o processo de pré-aclimatização foi satisfatória, mas o processo de furar e retirar o filme PVP dos frascos, e manter nessas condições por 15 dias foi um fator indutor para o surgimento de fungos em alguns meios de cultura. Ao serem transferidas para o substrato comercial e para o solo em condições ambientais não suportaram tal estresse e vieram a senescer, causando assim a morte de todas as plântulas após 15 dias.

Algumas plantas oriundas do enraizamento *in vitro* mesmo estando bem enraizadas, inclusive com raízes ramificadas, não sobrevivem quando transplantadas para condições *ex vitro* (TIBOLA et al., 2004). Mesmo plantas com aspecto normal, podem sofrer e/ou não sobreviver nessa fase, em função do estresse pelo qual as plantas sofrem, por causa da súbita mudança de umidade relativa, que ocorre na passagem das condições *in vitro* para *ex vitro* (SEELYE; BURGE; MORGAN, 2003; APÓSTOLO; BRUTTI; LLORENTE, 2005). Outros fatores limitantes nessa fase ocorrem em função das plantas nas condições *ex vitro* passarem para um estado autotrófico necessitando fazer fotossíntese para sobreviver e precisam rapidamente incrementar a absorção de sais, estando sujeitas ao ataque de microorganismos (KADLECEK et al., 2001).

Com relação ao crambe, poucos protocolos de micropropagação descrevem o processo de aclimatização (LI et al., 2010, 2011; CHHIKARA et al., 2012), mas, Palmer e Keller (2011) registraram 70% de sobrevivência na aclimatização, sem, contudo, divulgar a metodologia.

A micropropagação pode ser afetada por uma série de fatores, como por exemplo, a idade do explante, nutrientes, orientação do explante, tipos e concentração de reguladores de crescimento, e também do tempo de cultivo e subcultivo (SHUKLA; SAWHNEY, 1991). Tomando todos esses fatores em consideração, o tempo de cultura e o elevado período sob influência dos reguladores de crescimento podem ter afetado o processo de micropropagação neste estudo.

4- CONCLUSÕES

Ocorre uma frequência satisfatória de regeneração de brotos a partir de segmentos apicais de crambe em meios contendo 5 µM de BAP. O alongamento foi satisfatório com 1 µM de GA₃. Esse protocolo de regeneração de plantas *in vitro* pode ser útil no processo de criação e desenvolvimento de novas cultivares em um tempo mais curto usando explantes apicais. Existe a necessidade de se estabelecer um enraizamento e aclimatização eficiente para completa propagação *in vitro* de crambe.

5- REFERÊNCIAS

- ANDERSON, M.D.; PENG, C.; WEISS, M.J. Crambe *Crambe abyssinica* Hochst., as a flea beetle resistant crop (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 85, p. 594-600, 1992.
- APÓSTOLO, N.M.; BRUTTI, C.B.; LLORENTE, B.E. Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 41, p. 307–313, 2005.
- ARTUS, N.N. Arsenic and cadmium phytoextraction potential of crambe compared with Indian mustard. **Journal of Plant Nutrition**, v. 29, p. 667-679, 2006.
- ASSIS, T.F.; TEIXEIRA S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPq, 1998. v.1. p. 261-296.
- BARROS, A.P.B.; MACHADO, M.F.; MARRA, S.H.doC.M.; BRASIL, A.N.; NUNES, D.N. Avaliação de tratamentos para superação de dormência em sementes de *Crambe abyssinica*. In: congresso brasileiro de plantas oleaginosas, 6. Montes Claros-MG. **Anais**. 2009. Disponível em: <http://www.enerbio.ind.br/wp-content/uploads/2011/05/a5__545-Avaliacao-de-Tratamentos-para-Superacao-de-Dormencia.pdf>. Acesso: 05 out. 2011.
- BRUM, G.R.; SILVA, A.B.; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência Agrotécnica**, v. 26, n. 2, p. 1403-1409, 2002.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPq, 1998. v.1. p.87-132.
- CHENG, P.K.; LAKSHMANAN, P.; SWARUP, S. High-frequency direct shoot regeneration and continuous production of rapid-cucling *Brassica oleracea in vitro*. **In Vitro Cellular Development Biology – Plant**, v. 37, p. 592-598, 2001.

- CHHIKARA, S.; DUTTA, I.; PAULOSE, B.; JAIWAL, P. K.; DHANKHER, O. P. Development of an *Agrobacterium*-mediated stable transformation method for industrial oilseed crop *Crambe abyssinica* 'BelAnn'. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 457-465, 2012.
- CHUANG, S.J.; CHEN, C.L.; CHEN, J.J.; CHOU, W.Y.; SUNG, J.M. Detection of somaclonal variation in micro-propagated *Echinacea purpurea* using AFLP marker. **Scientia Horticulturae**, v. 120, p. 121-126, 2009.
- CONCEIÇÃO, M.K.da; LOPES, N.F.; FORTES, G.R.deL. Partição de matéria seca entre órgãos de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), cultivares Abóbora e Da Costa. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 10, p. 313-316, 2004.
- DAHLKE, C. F.; SIMONETTI, A. P. M. M. Interferência de diferentes temperaturas na germinação do crambe. **Cultivando o Saber**, Cascavel, v. 3, n. 4, p. 167-174, 2010.
- DAS, A.; KESARI, V.; RANGAN, L. Plant regeneration in *Curcuma* species and assessment of genetic stability of regenerated plants. **Biologia Plantarum**, v. 54, p. 423-429, 2010.
- DUTRA, L.F.; OLIVEIRA, A.F.; FRÁGUAS, C.B.; PASQUAL, M. Comunicação: Multiplicação *in vitro* de Oliveira (*Olea europaea* L.) Olive (*Olea europaea* L.) *in vitro* multiplication. **Ciência Agrotecnologia**, v. 28, n. 1, p. 220-223, 2004.
- EL SAWY, M.A. Somaclonal variation in micro-propagated strawberry detected at the molecular level. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 5, p. 721-725, 2007.
- ERIG, A.C.; GERSON, A.R.; FORTES, R.L. 6-benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira – preta (*Rubus idaeus* L.), cv. tupy. **Ciência Rural**, v. 32, n. 5, p. 765-770, 2002.
- FALASCA, S.L.; FLORES, N.; LAMAS, M.C.; CARBALLO, S.M.; ANSCHAU, A. *Crambe abyssinica*: An almost unknown crop with a promissory future to produce biodiesel in Argentina. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 5808-5812, 2010.
- FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; MALDANER, J. Propagação clonal rápida de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken utilizando thidiazuron. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2007.
- FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; MALDANER, J.; GARLET, T.M.B. Benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n. 3, p. 292-299, 2009.
- GAO, H.B.; WANG, Y.; GAO, F.; LUO, P. Studies on the Plant regeneration from single cell culture of *Crambe abyssinica*. **Hereditas**, v. 20, p. 50-52, 1998.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPQ, 1998. v.1. p.183-260.

GRIMALDI, F.; GROHSKOPF, M.A.; MUNIZ, A.W.; GUIDOLIN, A.F. Enraizamento *in vitro* de frutíferas da família Rosaceae. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 7, n. 2, p. 160-168, 2008.

GUO, D.P.; ZHU, Z.J.; HU, X.X.; ZHENG, S.J. Effect of cytokinins on shoot regeneration from cotyledon and leaf segment of stem mustard (*Brassica juncea* var. tsatsai). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 83, p. 123-127, 2005.

HAN, B.H.; PAEK, K.Y.; CHOI, J.K. Structural characteristics of vitrified and glaucous plantlets in *Gypsophila paniculata* L. *in vitro*. **Journal of Korean Society for Horticultural Science**, v. 33, n. 2, p. 177-189, 1992.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, F.T. **Plant propagation: principles and practices**. 5.ed. New Jersey: [s.n.], 1990. 647p.

ISHIGAKI, G.; GONDO, T.; SUENAGA, K.; AKASHI, R. Multiple shoot formation, somatic embryogenesis and plant regeneration from seed-derived shoot apical meristems in ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*). **Grassland Science**, v. 55, p. 46-51, 2009.

ISHIGAKI, G.; GONDO, T.; SUENAGA, K.; AKASHI, R. Multiple shoot formation, somatic embryogenesis and plant regeneration from seed-derived shoot apical meristems in ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*). **Grassland Science**, v. 55, p. 46-51, 2009.

JASPER, S.P.; BIAGGIONI, M.A.M.; SILVA, P.R.A. Comparação do custo de produção do crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) com outras culturas oleaginosas em sistema de plantio direto. **Revista Energia na Agricultura**, Botucatu, vol. 25, n. 4, p. 141-153, 2010.

JORDAN, M.; OYANEDEL, E. Regeneration of *Pouteria lucuma* (Sapotaceae) plants *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 31, p. 249-252, 1992.

KADLECEK, P.; TICHÁ, I.; HASEL, D.; CAPKOVÁ, V.; SCHAFER, C. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. **Plant Science**, v. 161, p. 695-701, 2001.

KHAWAR, K.M.; SANCAK, C.; URANBEY, S.; ÖZCAN, S. Effect of thidiazuron on shoot regeneration from different explants of lentil (*Lens culinaris* Medik.) via organogenesis. **Turk Journal Botany**, v. 28, p. 421-426, 2004.

KMEC, P.; WEISS, M.J.; MILBRATH, B.G.; SCHATZ, J.; HANZEL, B.K.; HANSON, ERIKSMOEN, E.D. Growth analysis of crambe. **Crop Science**, v. 38, p. 108-112, 1998.

LARA-FIOREZEA, A.C.C.; TOMAZA, C.A.; FIOREZEA, S.L.; PILONB, C.; ZANOTTO, M.D. Genetic diversity among progenies of *Crambe abyssinica* Hochst for seed traits Industrial. **Crops and Products**, v. 50, p. 771-775, 2013.

LEELA, T.; NARESH, B.; REDDY, M.S.; MADHUSUDHAN, N.Ch.; CHERKU, P.D. Morphological, physico-chemical and micropropagation studies in *Jatropha curcas* L. and RAPD analysis of the regenerants. **Applied Energy**, v. 88, p. 2071-2079, 2011.

- LI, X.; AHLMAN, A.; LINDGREN, H.; ZHU, L.H. Highly efficient *in vitro* regeneration of the industrial oilseed crop *Crambe abyssinica*. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 170-175, 2011.
- LI, X.; AHLMAN, A.; YAN, X.; LINDGREN, H.; ZHU, L.-H. Genetic transformation of the oilseed crop *Crambe abyssinica*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 100, p. 149-156, 2010.
- LI, X.; FAN, J.; GRUBER, J.; GUAN, R.; FRENTZEN, M.; ZHU, L.-H. Efficient selection and evaluation of transgenic lines of *Crambe abyssinica*. **Frontiers in Plant Science - Plant Biotechnology**, v. 4, n. 162, p. 1-9, 2013.
- LOPES, L.C.; MACHADO, I.S.; MAGOGA, E.C.; ANDRADE, J.G.de; PENNA, H.C.; MORAES, L.E.F. Cultura de embrião e indução de brotos *in vitro* para micropropagação do pinhão-mansô. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 7, p. 900-905, 2012.
- MEMON, S.A.; HOU, X.; ZHU, B.; WOLUKAU, J.N. High-frequency adventitious shoots regeneration from leaf of non-heading Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*) cultured *in vitro*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 1191-1196, 2009.
- MEMON, S.A.; HOU, X.; ZHU, B.; WOLUKAU, J.N. High-frequency adventitious shoots regeneration from leaf of non-heading Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*) cultured *in vitro*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 1191-1196, 2009.
- MIETKIEWSKA, E.; BROST, J.M.; GIBLIN, E.M.; BARTON, D.L.; TAYLOR, D.C. Cloning and functional characterization of the fatty acid elongase 1 (FAE1) gene from high erucic *Crambe abyssinica* cv. Prophet. **Plant Biotechnology Journal**, v. 5, n. 5, p. 636-645, 2007.
- MIGUEL, C.; MARUM, L. An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 11, p. 3713-3725, 2011.
- MONFORT, L.E.F.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; ROSSI, Z.T.T.; SANTOS, F.M. Efeito do BAP no cultivo *in vitro* de *Ocimum selloi* Benth. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 458-463, 2012.
- MOURA, L.C.de; TITON, M.; MIRANDA, N.A.; MOREIRA, T.P.; OLIVEIRA, M.L.R.de. Multiplicação e alongamento *in vitro* de vinhático (*Plathymenia reticulata*). **Scientia Forestalis**, v. 40, n. 96, p. 499-505, 2012.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tabaco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NAZ, S.; TABASSUM, F.; JAVAD, S.; ILYAS, S.; ASLAM, F.; MUNIR, N.; ALI, A. Micropropagation and callogenesis of a recalcitrant species *Ricinus communis*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, n. 5, p. 2419-2422, 2011.
- NEVES, M.B.das; TRZECIAK, M.B.; VINHOLES, P.daS.; TILLMANN, C.A.daC.; VILLELA, F.A. **Qualidade fisiológica de sementes de crambe produzidas em Mato Grosso do Sul**. Disponível em:

<http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/livro/Agroenergia_2007/Agroener/trabalhos/Outras%20culturas_11_OK/Neves_1.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2010.

PAEK, K.Y.; CHANDLER, S.F.; THORPE, T.A. Micropropagation of *Raphanus sativus* L. var. longipinnatus (Japanese radish) cv. Gungjung. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 9, p. 159-165, 1987.

PAIVA, P.D.O de; JOSÉ, S.C.B.R.; PASQUAL, M.; PAIVA, R. Efeito do ácido naftaleno acético e GA₃ na micropropagação de violeta. **Revista Ceres**, v. 44, n. 254, p. 392-398, 1997.

PAIVA, P.D.O.; MAYER, M.B.D.; CAMPOS, R.J.C.; RODRIGUES, V.A.; PASQUAL, M. Propagação *in vitro* de gloxínia. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 3, n. 2, p. 29-41, 1997.

PALMER, C.D.; KELLER, W.A. Somatic embryogenesis in *Crambe abyssinica* Hochst. Ex R.E. Fries using seedling explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 104, p. 91-100, 2011.

PASQUAL, M.; ALVES, G.P.; DUTRA, L.F.; FINOTTI, D.R.; CHAGAS, E.A. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerina 'Poncã': concentrações do meio MS e da sacarose. **Revista Ceres**, v. 49, n. 282, p. 181-189, 2002.

PATHAK, H.; DHAWAN, V. ISSR assay for ascertaining genetic fidelity of micropropagated plants of apple rootstock Merton 793. **In Vitro Cellular Development Biology - Plant**, v. 48, p. 137-143, 2012.

PATI, P.K.; RATH, S.P.; SHARMA, M.; SOOD, A.; AHUJA, P.S. *In vitro* propagation of rose: a review. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 94-114, 2006.

PAUL, A.; THAPA, G.; BASU, A.; MAZUMDAR, P.; KALITA, M.C.; SAHOO, L. Rapid plant regeneration, analysis of genetic fidelity and essential aromatic oil content of micropropagated plants of Patchouli, *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. – An industrially important aromatic plant. **Industrial Crops and Products**, v. 32, 366-374, 2010.

PAULOSE, B.; KANDASAMY, S.; DHANKHER, O.P. Expression profiling of *Crambe abyssinica* under arsenate stress identifies genes and gene networks involved in arsenic metabolism and detoxification. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 108, p. 1-12, 2010.

PAVLOVIC, S.; ADŽIC, S.; CVIKIC, D.; ZDRAVKOVIC, J.; ZDRAVKOVIC, M. *In vitro* culture as a part of *Brassica oleracea* var. Capitata L. breeding. **Genetika**, v. 44, n. 3, p. 611-618, 2012.

PAVLOVIC, S.; ADŽIC, S.; CVIKIC, D.; ZDRAVKOVIC, J.; ZDRAVKOVIC, M. *In vitro* culture as a part of *Brassica oleracea* var. Capitata L. breeding. **Genetika**, v. 44, n. 3, p. 611-618, 2012.

PERES, L.E.P.; KERBAUY, G.B. Citocininas. In: KERBAUY, G.B. (ed.) **Fisiologia vegetal**. Guanabara, Rio de Janeiro, 2004, p.250-278.

PITOL, C. Cultura do crambe. **Tecnologia e produção: milho safrinha e culturas de inverno** 2008. Fundação MS, 2008.

PURKAYASTHA, J.; SUGLA, T.; PAUL, A.; SOLLETI, S.K.; MAZUMDAR, P.; BASU, A.; MOHOMMAD, A.; AHMED, Z.; SAHOO, L. Efficient *in vitro* plant regeneration from shoot apices and gene transfer by particle bombardment in *Jatropha curcas*. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 1, p. 13-20, 2010.

PURKAYASTHA, J.; SUGLA, T.; SOLLETI, S.K.; PAUL, A.; SAHOO, L. Rapid *in vitro* multiplication and plant regeneration from nodal explants of *Andrographis paniculata*: a valuable medicinal plant. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 43, p. 409-414, 2008.

PUROHIT, S.D.; SINGHVI, A. Micropropagation of *Achras sapota* through enhanced axillary branching. **Scientia Horticulturae**, v. 76, p. 219-229, 1998.

QUOIRIN, M.G.G.; BIASI, L.A.; RIOS, J.F.; CUQUEL, F.L. Micropropagação de gypsophila pela cultura de segmentos nodais. **Scientia Agraria**, v. 9, n. 1, p. 79-83, 2008.

RADMANN, E.B.; BIANCHI, V.J.; FACHINELLO, J.C.; FERREIRA, L.V.; OLIVEIRA, R.P.de. *In vitro* multiplication of 'Flordaguard' rootstock: cytokinin source and concentration effects, explants orientation and period of permanence in the culture medium. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 1, p. 25-34, 2011.

RAY, A.; BHATTACHARYA, S. Storage and conversion of *Eclipta alba* synseeds and RAPD analysis of the converted plantlets. **Biologia Plantarum**, v. 54, p. 547-550, 2010.

ROCHA, P.S.G.; SCHUCH, M.W.; BIANCHI, V.J.; FACHINELLO, J.C. Multiplicação e alongamento *in vitro* do porta-enxerto de Prunus. **Bioscience Journal**, v. 25, n. 1, p. 69-74, 2009.

ROSCOE, R.; RICHETTI, A.; MARANHO, E. Análise de viabilidade técnica de oleaginosas para produção de biodiesel em Mato Grosso do Sul. **Revista de Política Agrícola**, v. 16, p. 48-59, 2007.

ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 91-120, 2000.

ROUT, G.R.A.; MOHAPATRA, A.A.; JAIN, S.M.B. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 531-560, 2006.

RUBIN, S.; LIMA, C. S. M.; BANDEIRA, J. DE M.; RIBEIRO, M. V.; BENITZ, L.C.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 480-482, 2007.

SEELYE, J.F.; BURGE, G.K.; MORGAN, E.R. Acclimatizing Tissue Culture Plants: Reducing the Shock. **Combined Proceedings International Plant Propagators' Society**, v. 53, p. 85-90, 2003.

SHARMA, S.; PAMIDIMARRI, D.V.N.S.; ANANDA, K.G.V.; REDDY, M.P. Assessment of genetic stability in micropropagules of *Jatropha curcas* genotypes by RAPD and AFLP analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 1003-1009, 2011.

SHUKLA, A.; SAWHNEY, V.K. Comparative regenerative ability of internodal segments of wild type and a genic male sterile line of rapeseed (*Brassica napus*) cultured *in vitro*. **Plant Science**, v. 79, p. 95-98, 1991.

SHUKLA, A.; SAWHNEY, V.K. Comparative regenerative ability of internodal segments of wild type and a genic male sterile line of rapeseed (*Brassica napus*) cultured *in vitro*. **Plant Science**, v. 79, p. 95-98, 1991.

SHUKLA, A.; SAWHNEY, V.K. Comparative regenerative ability of internodal segments of wild type and a genic male sterile line of rapeseed (*Brassica napus*) cultured *in vitro*. **Plant Science**, v. 79, p. 95-98, 1991.

SIGMAPLOT: EXACT GRAPHS AND DATA ANALYSIS. Version 10.0. **Systat Software**, Alemanha, URL: <http://www.sigmaplot.com/index.php>, 2006.

SILVA, E.C.; PINTO, C.A.; SOUZA-DIAS, J.A.C; ARAÚJO, T.H. Uso de reguladores de crescimento em brotos destacados de batata-semente. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 504-509, 2011.

SILVA, F.deA.S.E.; AZEVEDO, C.A.V.de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: **WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE**, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SINGH, S.K.; RAI, M.K.; SAHOO, L. An improved and efficient micropropagation of *Eclipta alba* through transverse thin cell layer culture and assessment of clonal fidelity using RAPD analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 328-333, 2012.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 11, p. 118-131, 1957.

SUGLA, T.; PURKAYASTHA, J.; SINGH, S.K.; SOLLETI, S.K.; SAHOO, L. Micropropagation of *Pongamia pinnata* through enhanced axillary branching. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 43, p. 409-414, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2006. **Fisiologia vegetal**. 722 p. 3ed. Porto Alegre, Artmed.

TIBOLA, C.S.; RADMANN, E.B.; RODRIGUES, A.C.; FORTES, G.R.deL.; FACHINELLO, J.C. Diferentes meios de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* sp. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 10, n. 2, p. 191-195, 2004.

VILLA, F.; ARAÚJO, A.G.de; PIO, L.A.S.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* da amoreira-preta 'ébano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 3, p. 582-589, 2005.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; ASSIS, F.A.; PIO, L.A.S.; ASSIS, G.A. Crescimento *in vitro* de amoreira-preta: Efeito de reguladores de crescimento e da cultivar. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1754-1759, 2008.

VINTERHALTER, D.; SRETENOVIC-RAJICIC, T.; VINTERHALTER, B.; NINKOVIC, S. Genetic transformation of *Brassica oleracea* vegetables. **Transgenic Plant Journal**, v. 1, p. 340-355, 2007.

WANG, Y.P.; SNOWDON, R.J.; RUDLOFF, E.; WEHLING, P.; FRIEDT, W.; SONNTAG, K. Cytogenetic characterization and fae1 gene variation in progenies from asymmetric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Crambe abyssinica*. **Genome**, v. 47, p. 724-731, 2004.

WANG, Y.P.; SONNTAG, K.; RUDLOFF, E. Development of rapeseed with high erucic acid content by asymmetric somatic hybridization between *Brassica napus* and *Crambe abyssinica*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, p. 1147-1155, 2003.

WANG, Y.P.; SONNTAG, K.; RUDLOFF, E.; WEHLING, P.; SNOWDON, R.J. GISH analysis of disomic *Brassica napus*-*Crambe abyssinica* chromosome addition lines produced by microspore culture from monosomic addition lines. **Plant Cell Report**, v. 25, p. 35-40, 2006.

WANG, Y.P.; TANG, J.S.; CHU, C.Q.; TIAN, J. A preliminary study on the introduction and cultivation of *Crambe abyssinica* in China, an oil plant for industrial uses. **Industrial Crops and Products**, v. 12, p. 47-52, 2000.

WANG, Y.P.; LUO, P. Intergeneric hybridization between Brassica species and *Crambe abyssinica*. **Euphytica**, v. 101, p. 1-7, 1998.

YANG, M.Z.; JIA, S.R.; PUA, E.C. High frequency regeneration from hypocotyls explants of *Brassica carinata* A. Br. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 24, p. 79-82, 1991.

ZOGLAMI, N.; BOUAMAMA, B.; KHAMMASSI, M.; GHORBEL, A.W. Genetic stability of long-term micropropagated *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. plantlets as assessed by molecular tools: Perspectives for *in vitro* conservation. **Industrial Crops and Products**, v. 36, p. 59-64, 2012.

ZULFIQAR, A.; PAULOSE, B.; CHHIKARA, S.; DHANKHER, O.P. Identifying genes and gene networks involved in chromium metabolism and detoxification in *Crambe abyssinica*. **Environmental Pollution**, v. 159, p. 3123-3128, 2011.

CAPÍTULO III

ESTABILIDADE GENÉTICA DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE *Crambe abyssinica* HOCHST UTILIZANDO MARCADORES ISSR

Estabilidade genética de plantas micropropagadas de *Crambe abyssinica* Hochst utilizando marcadores ISSR

RESUMO

O crambe (*Crambe abyssinica*) é uma erva anual, não alimentar, que foi cultivada inicialmente para extração de óleo para indústria, e, atualmente, tem grande potencial para produção de biodiesel. O objetivo desta investigação foi avaliar a estabilidade genética das plantas micropropagadas de *C. abyssinica* Hochst cv. FMS brilhante utilizando a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) baseada em marcadores moleculares ISSRs, com intuito de produzir um protocolo de regeneração *in vitro* dessas plantas com baixa variação genética em relação à planta doadora. Para o processo de micropropagação, segmentos apicais provenientes de plântulas germinadas *in vitro* foram utilizados como explante. Inicialmente, foram cultivados por 90 dias em meio MS com 5,0 μM de 6-benzilaminopurina (BAP), em que, aos 90 dias foi detectado o maior valor de número de brotos por explante (NBE) (12,20 brotos). Aos 120 dias, foi testada a interação entre as diferentes concentrações de BAP e ácido naftaleno acético (ANA), e os maiores valores encontrados para NBE foi com o tratamento 0,0/0,5 μM BAP/ANA (11,40 brotos) e 1,0/0,0 μM BAP/ANA (11,00 brotos). Na fase de enraizamento, as maiores taxas desta variável foram observadas com 0,5 μM ANA (30%). Os 13 *primers* ISSR utilizados para a análise da estabilidade genética, produziram 91 produtos de amplificação, sendo apenas 8 bandas polimórficas e 83 monomórficas para todas as 10 plantas de crambe regeneradas, comparando com a planta doadora de explante. Esses resultados indicam que o segmento apical de crambe é um explante altamente confiável para a micropropagação de plantas geneticamente verdadeiras (*true-to-type*), ou seja, que mantém a estabilidade genética verificada utilizando marcadores ISSR.

Palavras-chave: regeneração *in vitro*, variação somaclonal, marcadores moleculares, segmento apical, brotos.

ABSTRACT

Genetic stability of micropropagated plants of *Crambe abyssinica* Hochst using ISSR markers

The crambe (*Crambe abyssinica*) is an annual herb, non-food, that was initially cultivated for oil extraction for industry, and, currently, has great potential for biodiesel production. The objective of this investigation was to evaluate the genetic stability of micropropagated plants of *C. abyssinica* Hochst cv. FMS brilhante using PCR tecnicas (polymerase chain reaction) based in molecular markers ISSRs, aiming to produce a protocol for *in vitro* regeneration of these plants with low genetic variation compared to donor plant. For the process of micropropagation, shoot tips from *in vitro* germinated seedlings were used as explants. Were initially cultivated for 90 days on MS medium with 5.0 μM 6-benzylaminopurine (BAP), which, at 90 days was detected the highest value of number of shoots per explant (NSE) (12.20 shoots). After 120 days was tested the interaction between the different concentrations of BAP and naphthalene acetic acid (NAA), and the highest values were found for NSE treatment with 0.0/0.5 μM BAP/NAA (11.40 shoots) and 1.0/0.0 μM BAP/NAA (11.00 shoots). For rooting phase, the highest rates of this variable were observed with 0.5 μM NAA (30 %). The 13 ISSR primers used for the analysis of the genetic stability, produced 91 amplification products, of which only 8 bands polymorphic and 83 were monomorphic for all 10 plants regenerated of crambe, compared to the donor plant explant. These results indicate that the shoot tips of crambe is a highly reliable explant for micropropagation of plants genetically true-to-tipe, or, keeping the genetic stability verified using ISSR markers.

Key words: *in vitro* regeneration, somaclonal variation, molecular markers, shoot tips, shoot.

1- INTRODUÇÃO

O crambe (*Crambe abyssinica* - Brassicaceae; $2n = 6x = 90$) é uma herbácea anual, não alimentar (PAULOSE et al., 2010), nativa da região mediterrânea, cultivada inicialmente para extração de óleo para indústria (WANG et al., 1999; ZULFIQAR et al., 2011) e com grande potencial para produção de biodiesel (WANG et al., 2000; ROSCOE et al., 2007). O óleo extraído das sementes possui elevado teor de ácido erúico no óleo extraído das sementes (50-60%) (LI et al., 2010; LARA-FIOREZEA et al., 2013) utilizado para a produção de lubrificantes, plásticos, inibidor de corrosão, borracha sintética, assim como produtos cosméticos (WANG et al., 2004; FALASCA et al., 2010; LARA-FIOREZEA et al., 2013).

Além disso, características agronômicas tais como, ciclo de vida curto (aproximadamente 90 dias) (WANG et al., 2003; CHHIKARA et al., 2012), biomassa elevada (ZULFIQAR et al., 2011), rendimento médio de sementes de 1800-2400 kg ha⁻¹ (CHHIKARA et al., 2012), cultivo em diferentes condições climáticas (WANG et al., 2000), resistência a insetos (ANDERSON et al., 1992; KMEC et al., 1998), tolerância a estresses abióticos, como salinidade, baixas temperaturas, calor, seca (WANG et al., 2000; CHHIKARA et al., 2012) e exposição a metais pesados (ARTUS, 2006; PAULOSE et al., 2010), podem tornar o crambe uma importante espécie dentro do cenário agrícola.

Entretanto, para que a cultura de crambe seja empregada de forma efetiva, intervenções biotecnológicas são exigidas para o fornecimento de material vegetal de qualidade (JOSHI; DHAWAN, 2007). Nesse contexto, as técnicas de cultura de células e tecidos *in vitro* são importantes tanto para a propagação massal (LI et al., 2010, 2011; PALMER; KELLER, 2011; CHHIKARA et al., 2012) como ferramenta para o melhoramento genético (WANG; LUO, 1998; WANG et al., 2003; WANG et al., 2004; WANG et al., 2006).

Uma eficaz regeneração de plantas *in vitro*, por meio das técnicas de cultura de tecidos, é um pré-requisito para a aplicação de ferramentas biotecnológicas com o intuito de melhorar a cultura (SINGH et al., 2012). Alguns trabalhos relacionados à micropropagação relatam a regeneração de crambe *in vitro* via organogênese direta (LI et al., 2010, 2011), organogênese indireta (CHHIKARA et al., 2012), ambos utilizando hipocótilos como explante, e via embriogênese somática indireta (PALMER; KELLER; 2011), este último com cotilédone, hipocótilo e raiz como explante. No entanto, não existe nenhuma informação publicada sobre a regeneração de crambe utilizando segmentos apicais, via multiplicação por meio da proliferação de gemas axilares.

A manutenção da estabilidade genética das plantas regeneradas *in vitro* com relação à planta mãe (doadora de explante) torna-se importante para detectar sutis variações fenotípicas, citológicas, bioquímicas e/ou moleculares (BORCHETIA et al., 2009; GOEL et al., 2009), possibilitando, dessa forma, um planejamento estratégico para a propagação de espécies com qualidade e uniformidade desejada antes de serem liberadas para fins comerciais (BHATIA et al., 2009).

Alguns trabalhos apresentam o surgimento de variações genéticas, epigenéticas e fenotípicas, conhecidas como variações somaclonais, ocorrendo durante os processos de regeneração *in vitro* (organogênese e embriogênese) (BENNICI et al., 2004; GOEL et al., 2009; MIGUEL; MARUM, 2011; ZOGHLAMI et al., 2012; PATHAK; DHAWAN, 2012; ZHAO et al., 2012).

No caso dos métodos de micropropagação envolvendo meristemas pré-existente, como gemas axilares e meristemas apicais, a literatura relata diversos estudos com diferentes espécies de plantas que mantiveram a estabilidade genética após as etapas de cultivo *in vitro*, tais como *Opuntia ficus-indica* (ZOGHLAMI et al., 2012), *Eclipta alba* (SINGH et al., 2012), *Jatropha curcas* (LEELA et al., 2011; SHARMA et al., 2011), *Camellia* spp. (BORCHETIA et al., 2011), *Evolvulus* spp. (MARITANO et al., 2010), *Gerbera jamesonii* (BHATIA et al., 2009), *Crataeva magna* (BOPANA; SAXENA, 2009), *Swertia chirayita* (JOSHI; DHAWAN, 2007), *Vanilla planifolia* (SREEDHAR et al., 2007).

Nesse sentido, os marcadores moleculares, principalmente os de DNA, são ferramentas poderosas e valiosas na análise da estabilidade genética de plantas propagadas *in vitro* (GHEORGHE et al., 2009; DEVARUMATH et al., 2002). Dentre esses marcadores, o uso do ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*) para avaliação da estabilidade genética é bem documentada (BHATIA et al., 2009; JOSHI; DHAWAN, 2007; LAKSHMANAN et al., 2007; LEROY et al., 2001) e, segundo Leroy et al. (2001), esses marcadores são considerados adequados para detectar variações derivadas do cultivo *in vitro* de plantas da família Brassicaceae, tais como, couve-flor (*Brassica oleracea*), colza (*Brassica napus*), rabanete (*Raphanus sativus*), crambe (*Crambe abyssinica*), dentre outras.

Considerando a inexistência de estudos de estabilidade genética de plantas de crambe propagadas *in vitro*, o objetivo desta investigação foi avaliar a estabilidade genética das plantas micropropagadas de *C. abyssinica* Hochst cv. FMS brilhante utilizando a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) baseada em marcadores moleculares ISSRs.

2- MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Plantas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo. Sementes de *C. abyssinica* Hochst da cultivar FMS brilhante, safra de 2012, obtidas com a Fundação MS, localizada em Maracaju, Mato Grosso do Sul, BR, foram utilizadas para o estabelecimento *in vitro* da cultura.

Fonte de explante

Segmentos apicais foram excisados de plântulas de crambe provenientes da germinação de sementes *in vitro*. As sementes foram inicialmente lavadas em água corrente com detergente neutro, e em condições assépticas na câmara de fluxo laminar foram desinfestadas por imersão em solução de antibiótico Penicilina (10 mg L^{-1}) e de Rifampicina (10 mg L^{-1}) por 30 minutos (min), álcool 70% por 1 min, seguido de hipoclorito de sódio comercial 50% (cloro ativo: 2-2,5%) por 30 min, e lavadas três vezes em água destilada autoclavada.

Meio de cultura e condições de cultivo

Para a germinação *in vitro* de sementes de crambe, foi utilizado o meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 15 g L^{-1} de sacarose e 7 g L^{-1} de ágar. Após 30 dias, foram retirados segmentos apicais de aproximadamente 2-3 cm para os ensaios de micropropagação.

Para a indução de brotos os explantes foram cultivados durante 90 dias em meio MS com $5 \text{ } \mu\text{M}$ de BAP (6-benzilaminopurina), suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrato de prata (AgNO_3) (LI et al., 2010) e 7 g L^{-1} de ágar. Foram realizados subcultivos e avaliações no tempo 30, 60 e 90 dias após a inoculação. A partir do terceiro subcultivo (90 dias), os brotos regenerados foram submetidos a tratamentos com intuito de reduzir a citocinina e introduzir auxina ao meio. Para isso, foi testado o efeito da interação entre as concentrações de BAP (0,0; 1,0; 3,0 e $5,0 \text{ } \mu\text{M}$) e ANA (ácido 1-naftalenoacético) (0,0 e $0,5 \text{ } \mu\text{M}$) em meio MS contendo 30 g L^{-1} de sacarose, $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de AgNO_3 e 7 g L^{-1} de ágar, sendo avaliados e subcultivados após 30 dias (tempo 120 dias).

A fase de enraizamento foi aplicada apenas no controle (0,0 μM) e nos três tratamentos que apresentavam brotos com melhor aspecto morfológico da interação de BAP e ANA (3,0/0,0; 5,0/0,0; 1,0/0,5 μM BAP/ANA). Foi utilizado primeiramente o meio MS $\frac{1}{2}$ com 0,5 μM ANA, por seguinte, os brotos foram transferidos para meio MS $\frac{1}{2}$ com 1,0 μM ANA e 0,1 μM BAP, ambos suplementado com 10 g L $^{-1}$ de sacarose, 100 mg L $^{-1}$ penicilina (LI et al., 2010; CHHIKARA et al., 2012), 0,5 mg L $^{-1}$ de AgNO $_3$ e 7,5 g L $^{-1}$ de ágar. A avaliação ocorreu após 30 dias nos meios de enraizamento descritos, tempo 150 e 180 dias, respectivamente.

Em todas as etapas, os meios de cultivo tiveram seu pH ajustado para 5,8, vertidos em tubo de ensaio (10 ml) e autoclavados a 1,1 atm, 121 °C, por 20 minutos. Todas as culturas foram incubadas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro), sob lâmpadas fluorescentes fornecendo 25,2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de fluxos de fótons fotossintéticos, e temperatura de 25 \pm 1 °C.

Aclimatização das plantas regeneradas

Nesta etapa, foram utilizadas plantas (3-5 cm) com parte aérea e raiz bem desenvolvida, provenientes dos tratamentos de enraizamento. Após 180 dias do início da micropropagação foi efetuada uma pré-aclimatização, que consistiu em transferir as plântulas do tubo de ensaio (25x150 mm) para frascos (80x150 mm) fechados com MS $\frac{1}{4}$, 7,5 g L $^{-1}$ de ágar, sem adição de sacarose e mantidas por 30 dias (tempo 210 dias) nas condições de sala de crescimento descritas. O segundo passo da aclimatização foi mantê-las em frascos fechados com substrato comercial (Vivato Slim $^{\text{®}}$) autoclavado, nutridas com solução de MS sem sacarose e mantidas por 30 dias em local com luz e temperatura ambiente (tempo 240 dias). Após essa etapa, as plantas foram transferidas para copos de plástico fosco, com latossolo vermelho-amarelo distrófico corrigido, autoclavado e nutrido com solução de macro e micronutrientes do meio MS. As plantas foram mantidas em casa de vegetação a uma temperatura média de 29 °C, sendo irrigadas sempre que necessário, para manter a umidade adequada para as plantas.

Avaliações morfológicas

As avaliações fitotécnicas foram realizadas nas diferentes fases da micropropagação nos tempos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias. Foram mensuradas as seguintes variáveis: número de brotos por explante (NBE), comprimento médio dos brotos (CMB), porcentagem de

enraizamento (%Enraiz.) e porcentagem de sobrevivência (%Sobrev.). As medições de CMB foram realizadas com auxílio de um paquímetro digital. A %Sobrev. foi avaliada nos tempos 210 e 240 dias na aclimatização.

Avaliação da estabilidade genética

A estabilidade genética entre a planta doadora de explante e 10 plantas regeneradas *in vitro* foi analisada utilizando marcadores moleculares de DNA do tipo ISSR, baseada na técnica de PCR. Após a excisão do segmento apical, no início do processo de micropropagação, o tecido vegetal de cada planta doadora de explante foi identificado, congelado e armazenado a -30 °C. Todos os brotos gerados a partir desse explante foram identificados com a numeração correspondente à sua origem. Também foram utilizados tecidos foliares de 10 plantas regeneradas e aclimatizadas em substrato comercial (210 dias).

O DNA das amostras foi extraído a partir da planta toda segundo metodologia de Doyle e Doyle (1990) com algumas modificações propostas por Abdelnoor et al. (1995). A concentração do DNA foi determinada por Espectrofotômetro UV-Vis (Femto Cirrus 80-S) e Nanodrop (Thermo scientific). A qualidade foi verificada após a eletroforese em 0,8% de gel de agarose e armazenados a -30 °C até o uso.

Inicialmente, foram testados vinte *primers* ISSR da *University of British Columbia* (UBC, Vancouver, Canadá), sendo 13 selecionados para o ensaio de estabilidade genética devido à reprodutibilidade, nitidez das bandas e por apresentarem polimorfismo em outras espécies.

As amplificações foram realizadas em um volume final de 25 µl contendo 30 ng de DNA genômico, 0,2 µM de cada *primer*, 0,25 mM de cada nucleotídeo (dNTP), 2,5 mM de MgCl₂, 0,25 mM de Tris-KCl (pH: 8,3) e 1 unidade de Taq polimerase.

As amplificações foram realizadas em termociclador (Thechne TC 412). Para os *primers* UBC 810, 834, 841, 849, 855, 857, 859, 864, 879, 889 e 890 foram utilizadas as seguintes condições: 15 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos constituídos por três etapas: a) 30 segundos a 94 °C, b) 30 segundos a 52 °C e c) 1 minuto a 72 °C, com uma etapa final de 7 minutos a 72 °C. Os *primers* UBC 827 e 845 foram amplificados nas condições: 15 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos constituídos por três etapas: a) 1 minuto a 94 °C, b) 1 minuto a 52 °C e c) 2 minutos a 72 °C, com uma etapa final de 7 minutos a 72 °C.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2,5%, contendo 0,02 µL mL⁻¹ de brometo de etídeo em tampão TBE (Tris 0,89 M, Ácido bórico

0,89 M e EDTA 0,02 M), a 110 volts por aproximadamente três a quatro horas. Um marcador de peso molecular de DNA (Ladder 100pb - Fermentas[®]) determinou distinção e estimação da massa molecular dos fragmentos obtidos. Terminada a corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, pelo sistema de Fotodocumentação L PIX HE da Loccus Biotecnologia[®]. A análise dos géis consistiu de presença/ausência de bandas entre a planta doadora e as plantas regeneradas.

Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram instalados em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC). A indução de brotos com 5 µM BAP realizada aos 30, 60 e 90 dias possuía a cada tempo de análise 50 repetições, constituída por um explante cada. O efeito da interação entre as concentrações de BAP e ANA foi conduzido em esquema fatorial 4x2 (0,0; 1,0; 3,0 e 5,0 µM BAP x 0,0 e 0,5 µM ANA) com 5 repetições, compostas por 5 explantes cada. O mesmo número de repetições e explantes foram utilizados no enraizamento. Os dados de porcentagem de enraizamento (%Enraiz.) foram transformados por $[(x/100)+1]$.

Todos os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, depois de verificadas a normalidade e homogeneidade. Verificada a significância dos tratamentos, foi aplicado teste de média de Tukey, adotando-se 1 e 5% de probabilidade pelo software Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2009).

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os segmentos apicais provenientes de plântulas germinadas *in vitro* (Figura 1A e 1B) e cultivados em meio MS com 5,0 µM de BAP iniciou a indução de brotos com aproximadamente duas semanas de cultura. O aspecto morfológico dos regenerados aos 30 dias (Figura 1C) demonstra que o BAP foi efetivo na indução de novos brotos e quebra da dominância apical (DEVI et al., 1994; SUJATHA; REDDY, 1998). Aos 60 e 90 dias, essa efetiva indução demonstrou aspecto de tufos (Figura 1D e E, respectivamente). Semelhantes observações foram feitas em *Brassica napus* (Brassicaceae) (GHNAYA et al., 2008), *Eclipta alba* (Asteraceae) (SINGH et al., 2012) e *Gossypium hirsutum* (Malvaceae) (SHUKLA; SAWHNEY, 1991).

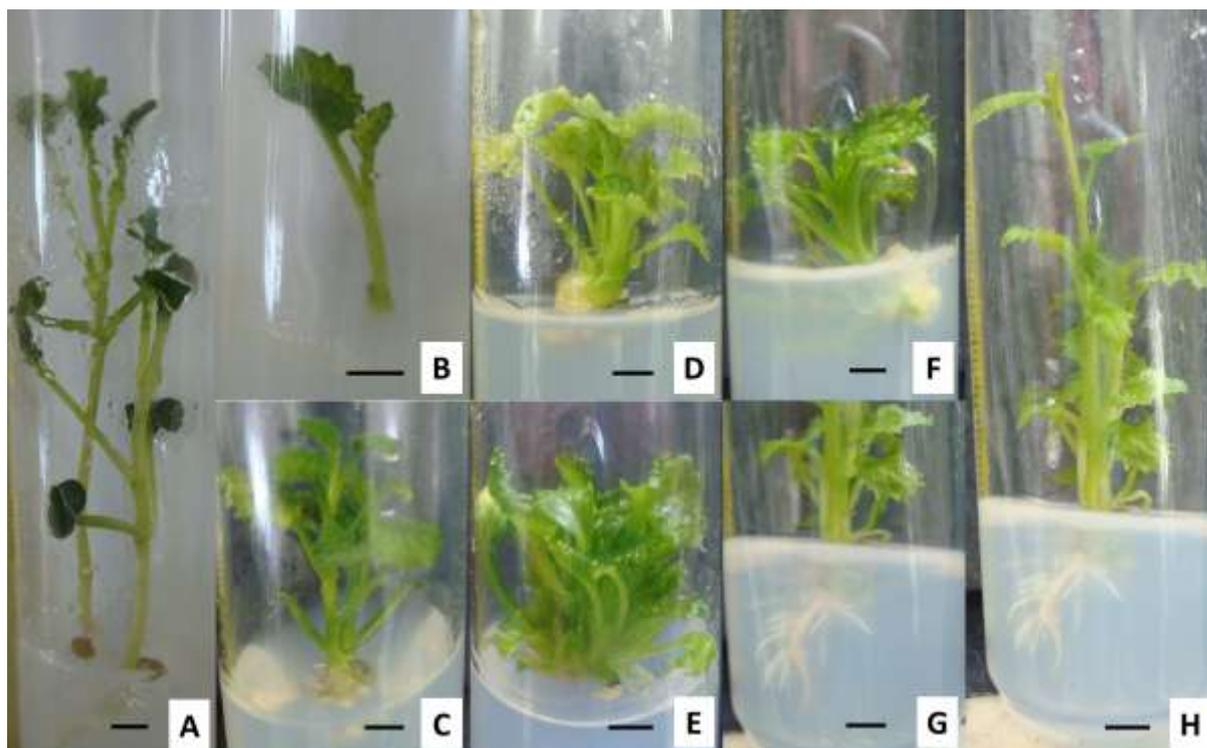


Figura 1 – Regeneração de *C. abyssinica* por meio de segmentos apicais. (A) Planta germinada *in vitro*; (B) Segmento apical utilizado como explante (0 dias); (C, D e E) Brotos induzidos com 5,0 μM BAP aos 30, 60 e 90 dias, respectivamente; (F) Brotos induzidos com 3,0 μM BAP aos 120 dias; (G e H) Enraizamento com 0,5 μM ANA (150 dias) (tratamento de origem: 3,0 μM BAP). Barra = 0,5 cm.

Os valores médios das características avaliadas nos explantes sob a influência desse regulador de crescimento aos 30, 60 e 90 dias estão representados na Tabela 1. O número de brotos por explante (NBE) foi significativamente afetado pelo tempo, em que aos 90 dias o valor foi mais proeminente (12,20 brotos), do que aos 30 e 60 dias (8,08 e 8,46 brotos, respectivamente). A dosagem de citocinina no meio de cultura foi suficiente para indução de brotos em crambe. Segundo Sun et al. (2009), é o ponto crítico para uma efetiva organogênese. O efeito promotor de BAP na indução de múltiplos brotos foi previamente relatado em espécies da família Brassicaceae (SHUKLA; SAWHNEY, 1991; MEMON et al., 2009; ISHIGAKI et al., 2009), e não foram encontrados trabalhos que descrevam o efeito desse regulador ao longo do tempo de cultivo *in vitro*.

Os valores de comprimento médio dos brotos (CMB) não foram significativamente diferentes aos 30, 60 e 90 dias, atingindo uma média de 28,18 mm durante o cultivo (Tabela 1). Isso demonstra que mesmo com os subcultivos, os brotos excisados mantêm uma taxa semelhante de crescimento. Observações similares foram feitas por Girija et al. (1999) e

George, Ravishanker e Venkataraman (1993), em que o maior número de brotos foi verificado no final do 2º subcultivo. Neste período de tratamento com 5 µM BAP não foi observado nenhuma raiz formada, indicando a necessidade de inserção de uma auxina para tal resposta. A porcentagem de sobrevivência foi em média de 91%. As pequenas perdas ocorreram devido à contaminação por fungos.

Tabela 1. Média do número de brotos por explante (NBE), comprimento médio dos brotos (CMB) e porcentagem de sobrevivência (%Sobrev.) em segmentos apicais de *C. abyssinica* sob a concentração 5,0 µM de BAP após 30, 60 e 90 dias de cultivo *in vitro*

Tempo (dias)	NBE	CMB (mm)	%Sobrev.
30	8,08 b	27,68 a	92,00 a
60	8,46 b	28,00 a	90,00 b
90	12,20 a	28,86 a	91,00 a
Média Geral	9,58	28,18	91,00
CV(%)	33,30	22,14	32,34

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.
CV(%): coeficiente de variação em porcentagem.

Aos 120 dias de tratamento, foi testada a interação entre as diferentes concentrações de BAP e ANA nos explantes. O aspecto morfológico (Figura 1F) e os resultados do presente estudo indicaram claramente que a capacidade de regeneração de brotos continuou com valores próximos ao verificado nos tempos de avaliação anteriores.

Na tabela 2 está o resumo da análise de variância mostrando que a interação de ambos os níveis dos fatores (BAP e ANA), aos 120 dias de cultivo, afetou significativamente apenas o NBE. Para o fator BAP, em separado, houve significância no CMB, %Enraiz e %Sobre. Para o fator ANA, apenas a variável %Enraiz foi influenciada de forma significativa (1%) pela concentração de ANA.

Tabela 2. Resumo da análise de variância para número de brotos por explante (NBE), comprimento médio dos brotos (CMB), porcentagem de enraizamento (%Enraiz.) e porcentagem de sobrevivência (%Sobrev.) de plântulas de *C. abyssinica* sob interação de diferentes concentrações de BAP e ANA após 120 dias de cultivo *in vitro*

FV	GL	Teste F			
		NBE	CMB	%Enraiz.	%Sobrev.
BAP (A)	3	6,82**	5,86**	4,26*	3,36*
ANA (B)	1	0,19 ^{ns}	2,33 ^{ns}	8,89**	1,68 ^{ns}
Int. A x B	3	4,40*	0,51 ^{ns}	2,71 ^{ns}	0,01 ^{ns}
Resíduo	32	-	-	-	-
Média Geral	-	8,72	25,09	9,37	92,50
CV (%)	-	20,46	17,82	15,75	13,17

** , * significativos a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente;

ns: não significativo;

CV(%): coeficiente de variação em porcentagem.

Entre todos os tratamentos empregados a partir da interação entre BAP e ANA aos 120 dias, os maiores valores encontrados para NBE foi no tratamento com 0,0/0,5 μM BAP/ANA (11,40 brotos) e 1,0/0,0 μM BAP/ANA (11,00 brotos) (Tabela 3). Contudo, analisando os fatores, dentro das concentrações de BAP testadas sem a adição de ANA a multiplicação de brotos foi superior em 1,0 μM BAP (11,00 brotos), sem diferenciar significativamente de 0,0 e 3,0 μM BAP. Nas concentrações de BAP com 0,5 μM ANA, a ausência de BAP (0,0 μM BAP) teve o maior valor (11,40 brotos) sem diferenciar de 1,0 μM BAP. A presença de 0,5 μM de ANA só demonstrou diferença significativa, comparando com sua ausência, quando empregada com 0,0 μM de BAP. Portanto, as menores concentrações de BAP (0,0 e 1,0 μM) na ausência ou presença de 0,5 μM de ANA melhor influenciaram na indução de brotos aos 120 dias, ressaltando também que a concentração de 5,0 μM BAP após 90 dias começou a apresentar sinais de decréscimo nessa característica avaliada.

Os efeitos positivos do BAP sobre a regeneração de uma ampla gama de explantes foram relatados em diferentes espécies de brássicas. Pavlovic et al. (2012) relataram que em segmentos nodais de *Brassica oleracea* a maior taxa de multiplicação de brotos foi em meios suplementados com 8,8 μM BAP + 5,0 μM AIB (ácido 3-indolbutírico). Uma alta frequência de brotos (100%) a partir de hipocótilos e combinação utilizando BAP e ANA foi conseguida em *B. carinata* (YANG et al., 1991). Sem adição de auxina ANA, e 4,44 μM BAP foi a concentração ideal para a regeneração de brotos em *B. juncea* (GUO et al., 2005). Li et al. (2011), utilizando 10 μM de thidiazuron (TDZ) e 2,5 μM ANA, relataram uma frequência de regeneração de brotos de 95% em hipocótilos de *C. abyssinica* cv. Galactica. Esses resultados

denotam a importância do balanço entre citocininas e auxinas, afetando a resposta morfogênica *in vitro*. Segundo Shukla e Sawhney (1991), a presença de BAP e ANA estimula a produção de brotos em vários tipos de explantes em brássicas, mas essa resposta é dependente da concentração empregada. Aumento da multiplicação de brotos pela adição de auxinas em baixo nível, juntamente com citocinina também tem sido relatado em muitas espécies de plantas (SHEKHAWAT et al., 2011; CHERUVATHUR et al., 2011; FAISAL et al., 2012; PHULWARIA et al., 2013a, 2013b). Vicente et al. (2009) também relataram que concentrações elevadas de BAP diminuiu o NBE devido, possivelmente, ao efeito fitotóxico dessa citocinina, relato esse que corrobora com o fato observado da diminuição do NBE aos 120 dias na presença de 5 μ M BAP.

Tabela 3. Média do número de brotos por explante (NBE) de plântulas de *C. abyssinica* sob interação de diferentes concentrações de BAP e ANA após 120 dias de cultivo *in vitro*

BAP (μ M)	ANA (μ M)	
	0	0,5
0,0	8,80 abB	11,40 aA
1,0	11,00 aA	8,80 abA
3,0	8,60 abA	6,40 bA
5,0	7,00 bA	7,80 bA

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Para a característica CMB aos 120 dias (Tabela 4), apenas as concentrações de BAP foram significativas, no qual o controle obteve valores superiores (30,19 mm) comparado com as demais concentrações testadas, as quais não diferenciaram significativamente. Os brotos obtidos em todas as combinações de BAP e ANA não alongaram, provavelmente devido ao efeito inibitório desses reguladores no comprimento. Isso mostra que o alongamento *in vitro* depende da retirada de BAP e ANA ou a incorporação de ácido giberélico (GA_3) ao meio, medida que estimularia o alongamento de cultivos tratados por um longo tempo e elevadas concentrações de BAP (PAUL et al., 2010). O efeito da promoção de GA_3 no alongamento de brotos atrofiados, em meio contendo elevadas concentrações ou por um longo tempo com

BAP, foi relatado em várias outras espécies de plantas (JORDAN; OYANEDEL, 1992; PUROHIT; SINGHVI, 1998; SUGLA et al., 2007; PURKAYASTHA et al., 2008).

Com relação à altura (comprimento da parte aérea) das brotações de *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae), Vicente et al. (2009) não observaram diferenças significativas entre as concentrações de BAP (4,44 a 22,2 μM), corroborando com o relatado para crambe. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), as citocininas estimulam a maior produção de partes aéreas das brotações até uma determinada concentração, a partir da qual ocorre diminuição da altura em virtude de um possível efeito fitotóxico. Esses resultados estão em conformidade com a literatura, cujos autores sugerem que esse regulador de crescimento não seja responsável pelo alongamento de brotos (PAIVA et al., 1997; PASQUAL et al., 2002; VILLA et al., 2005; TAIZ; ZEIGER, 2006).

Tabela 4. Comprimento médio dos brotos (CMB) de plântulas de *C. abyssinica* sob diferentes concentrações de BAP após 120 dias de cultivo *in vitro*

BAP (μM)	Médias (mm)
0,0	30,19 a
1,0	23,87 b
3,0	22,86 b
5,0	23,45 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

A porcentagem de enraizamento aos 120 dias foi maior no controle (25%) e com 1 μM de BAP (10%) (Tabela 5), e foi significativamente diferente na presença de 0,5 μM de ANA (17,50%) (Tabela 6). Normalmente, as espécies nos quais os explantes são mantidos anteriormente em determinados meios de cultura podem provocar efeitos residuais sobre a resposta morfogênica subsequente dos explantes (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). Polanco e Ruiz (1997) sugerem que existe um possível efeito inibidor da BAP na formação de raiz *in vitro*. Mendes et al. (2007), no experimento com *Vriesea cacuminis* L. B. Smith (Bromeliaceae), evidenciaram que na ausência de auxinas, explantes proveniente de meios de cultura com BAP não apresentaram enraizamento satisfatório. Resultados similares são

encontrados na literatura para diferentes espécies (MERCIER; KERBAUY, 1992, 1993; POLANCO; RUIZ, 1997; KOROCH et al., 2002).

Tabela 5. Porcentagem de enraizamento (%Enraiz.) de plântulas de *C. abyssinica* sob diferentes concentrações de BAP após 120 dias de cultivo *in vitro*

BAP (μM)	Médias (%)
0,0	25,00 a
1,0	10,00 ab
3,0	2,50 b
5,0	0,00 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Tabela 6. Porcentagem de enraizamento (%Enraiz.) de plântulas de *C. abyssinica* sob diferentes concentrações de ANA após 120 dias de cultivo *in vitro*

ANA (μM)	Médias (%)
0,0	1,25 b
0,5	17,50 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste F, a 1%.

A porcentagem de sobrevivência aos 120 dias (Tabela 7) foi elevada em todos os tratamentos testados. Contudo, os maiores valores foram verificados nas concentrações de 0,0, 1,0 e 3,0 μM BAP (97,50%), diferenciando significativamente apenas de 5,0 μM . Existem muitos relatos com base nos efeitos inibitórios de altas concentrações de BAP na taxa de multiplicação de brotos (BAIRU et al., 2008; FLORES et al., 2009; SHIRANI et al., 2010; MONFORT et al., 2012) e também na morte de explantes por sua toxidez (PARASHARAMI et al., 2003; KALIA et al., 2007). Contudo, elevadas taxas de sobrevivência foram observadas nessa fase em crambe.

Tabela 7. Porcentagem de sobrevivência (%Sobrev.) de plântulas de *C. abyssinica* sob diferentes concentrações de BAP após 120 dias de cultivo *in vitro*

BAP (μM)	Médias (%)
0,0	97,50 a
1,0	97,50 a
3,0	92,50 ab
5,0	82,50 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Para o enraizamento foram escolhidos, além do controle, os brotos dos tratamentos da interação entre BAP e ANA com melhor aspecto morfológico, valores intermediários para NBE e os que não possuíam calos em sua base. Portanto, brotos provenientes dos tratamentos com 0,0/0,0; 3,0/0,0; 5,0/0,0 e 1,0/0,5 μM BAP/ANA, foram inicialmente tratadas com 0,5 μM ANA por 30 dias (150 dias) e depois com 1,0 μM ANA + 0,1 μM BAP por mais 30 dias (180 dias). Nessas condições, houve baixas taxas de enraizamento e sem diferença estatística (Tabela 8). As maiores taxas de enraizamento foram observadas no controle, 30% com 0,5 μM ANA e 20% com 1,0 μM ANA + 0,1 μM BAP (Figura 1G e H).

Tabela 8. Efeito de 0,5 μM de ANA (150 dias) e 1,0 μM ANA + 0,1 μM BAP (180 dias) no número de brotos por explante (NBE), comprimento médio dos brotos (CMB) (mm), porcentagem de enraizamento (%Enraiz.) e porcentagem de sobrevivência (%Sobrev.), em plântulas de *C. abyssinica* provenientes do cultivo *in vitro* nos tratamentos com BAP e ANA

Tratamentos	0,5 μM ANA (150 dias)				1,0 μM ANA + 0,1 μM BAP (180 dias)			
	NBE	CMB	%Enraiz.	%Sobrev.	NBE	CMB	%Enraiz.	%Sobrev.
0,0 μM	6,35 b	28,08 b	30,00 a	100,00	7,96 c	25,61 c	20,00 a	95,00 a
3,0 μM BAP	16,40 a	50,05 a	25,00 a	100,00	14,45 ab	49,60 a	10,00 a	100,00 a
5,0 μM BAP	16,20 a	39,18 ab	10,00 a	100,00	13,41 b	35,51 bc	10,00 a	95,00 a
1,0 μM BAP + 0,5 μM ANA	15,65 a	41,43 a	5,00 a	100,00	18,70 a	40,25 ab	0,00 a	100,00 a
Média Geral	13,65	39,68	17,50	100,00	13,63	37,74	10,00	97,50
CV (%)	16,57	17,76	15,78	-	19,36	19,47	12,96	8,11

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Memon et al. (2009) obtiveram 90% de enraizamento em brotos de *Brassica campestris* no meio MS suplementado com 1 μM ANA, enquanto apenas 54,4% suplementado com 2,5 μM ANA. Os resultados de Li et al. (2010) com brotos adventícios gerados a partir de hipocótilos de *C. abyssinica* cv. Galactica não se aproximaram do presente trabalho, esses autores relatam que em 0,54 e 0,27 μM de ANA o enraizamento foi de 59 e 67%, respectivamente, enquanto 0,49 μM AIB e 0,25 μM de AIB tinham frequências baixas de enraizamento de 24 e 18%, respectivamente. Wang e Luo (1998) conseguiram enraizamento satisfatório em brotos de crambe gerados a partir de ovário imaturo após 15 dias com meio $\text{MS}^{1/2}$ + 0,28 μM AIB. Já Chhikara et al. (2012) induziram raiz em brotos gerados de calos de hipocótilos de crambe com 9,5 μM AIB, sem revelar a eficiência deste tratamento. Estes autores descrevem inicialmente, dificuldades para induzir o desenvolvimento das raízes em cultura e que isto foi superado pelo cultivo dos brotos em meio contendo GA_3 para o alongamento antes de sua transferência para o meio de indução de raízes. Assim, possivelmente, o longo tempo de cultura, excesso de BAP e o baixo comprimento dos brotos tornaram o enraizamento ineficiente no presente trabalho.

Esses resultados sugerem a possibilidade de que seja necessária a adição de algum cofator de enraizamento para a promoção da rizogênese nos explantes. A adição ao meio de cultura de compostos fenólicos como o floroglucinol e/ou o ácido florético (MENDES et al., 2007), carvão ativado (LONARDO et al., 2013) ou escuro (PAIVA NETO et al., 1998), antioxidantes (SOUZA; PEREIRA, 2007), conjuntamente com auxinas, poderia aumentar a porcentagem de enraizamento nos brotos de crambe cultivados *in vitro* com elevadas concentrações de BAP e por um tempo prolongado.

Com relação ao NBE e ao CMB aos 150 e 180 dias, os maiores valores estavam nas plântulas provenientes dos tratamentos com regulador de crescimento, sendo os maiores valores encontrados no tratamento com 3,0/0,0 μM BAP/ANA aos 150 dias (16,40 brotos) e com 1,0/0,5 μM BAP/ANA aos 180 dias (18,70) (Tabela 8). O CMB foi superior nas concentrações de 3,0/0,0 μM BAP/ANA, atingindo 50,05 mm aos 150 dias e 49,60 mm aos 180 dias. Estes resultados demonstram que apesar da retirada do BAP e inserção apenas de ANA para induzir o enraizamento, houve uma elevação nos valores de NBE e CMB se comparados com os outros tempos de análise. Nota-se, então, que existe um efeito residual do BAP por um período prolongado, afetando diretamente a fase de enraizamento. Segundo Paul et al. (2010) e Qin et al. (2007), utilizar auxinas e citocininas no meio de cultura são essenciais para uma eficiente indução e formação de brotos. Esses mesmos autores utilizaram apenas BAP e, também, associado com ANA, notando que a maior formação de brotos foi

obtida em meio contendo a combinação dos dois. Esse resultado também concorda com Cao e Earle (2003), em um trabalho com *Brassica oleracea* var. itálica (Brassicaceae). O mesmo foi observado neste trabalho, em que os maiores valores de brotos e comprimento registrados foram após a inserção de ANA junto ao meio de cultura.

A porcentagem de sobrevivência aos 150 e 180 dias continuou elevada, com 100% e 97,50%, respectivamente, independente do tratamento de origem dos brotos, contudo todos influenciados por regulador de crescimento. As diferentes respostas quanto à necessidade do uso de reguladores na regeneração *in vitro* tem sido relatada (TONONA et al., 2001; SILVA et al., 2005; AHN; CHEN, 2008; PRAMMANEE et al., 2011; CAI et al., 2011), e pode ser atribuída a fatores como tipo e estado fisiológico do explante (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; SILVA et al., 2008).

Para a aclimatização as plantas com maior número de raiz e com melhor aspecto morfológico, foram selecionadas dentro do tratamento de enraizamento aos 180 dias. Na pré-aclimatização houve a sobrevivência de 81,00% das plântulas (210 dias). Na aclimatização com substrato comercial o valor caiu para 44,00% (240 dias), e ao serem transferidas para o solo e casa de vegetação todas morreram após 10 dias.

Plantas micropropagadas muitas vezes não sobrevivem sem a aclimatização ou, mesmo sendo realizado esse processo, podem vir a morrer apenas alguns dias após a transferência para o solo, devido principalmente às condições durante os estágios anteriores de alongamento e enraizamento (VAN TELGEN et al., 1992; GOKHALE; BANSAL, 2009). A toxidez causada pelo excesso de reguladores vegetais no meio de cultura, ou pelo prolongado período de tempo em que a cultura permanece exposta a eles, pode provocar alterações genéticas, fisiológicas e morfológicas, resultando na redução da taxa de multiplicação e no encurtamento dos caules, o que dificulta a individualização das plantas, o processo de enraizamento e aclimatização (VICENTE et al., 2009).

O processo de aclimatização, ou seja, a transferência da planta do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*, é muitas vezes um passo crítico para a sobrevivência da planta (APÓSTOLO et al., 2005). Com relação ao crambe, poucos protocolos de micropropagação descrevem o processo de aclimatização (LI et al., 2010, 2011; CHHIKARA et al., 2012) mas, Palmer e Keller (2011) são os únicos que relataram 70% de sobrevivência na aclimatização, sem, contudo, divulgar a metodologia. Por isso, protocolos eficientes para aclimatização de plantas regeneradas de crambe a partir de segmentos apicais são necessários.

A avaliação da estabilidade genética foi realizada nas plantas provenientes dos tratamentos com 3,0/0,0 μM BAP/ANA e 1,0/0,5 μM BAP/ANA (Figura 2), por estarem com

melhor aspecto na fase de aclimatização com substrato comercial (210 dias). Todos os 10 regenerados testados foram originados da mesma planta doadora de explante.

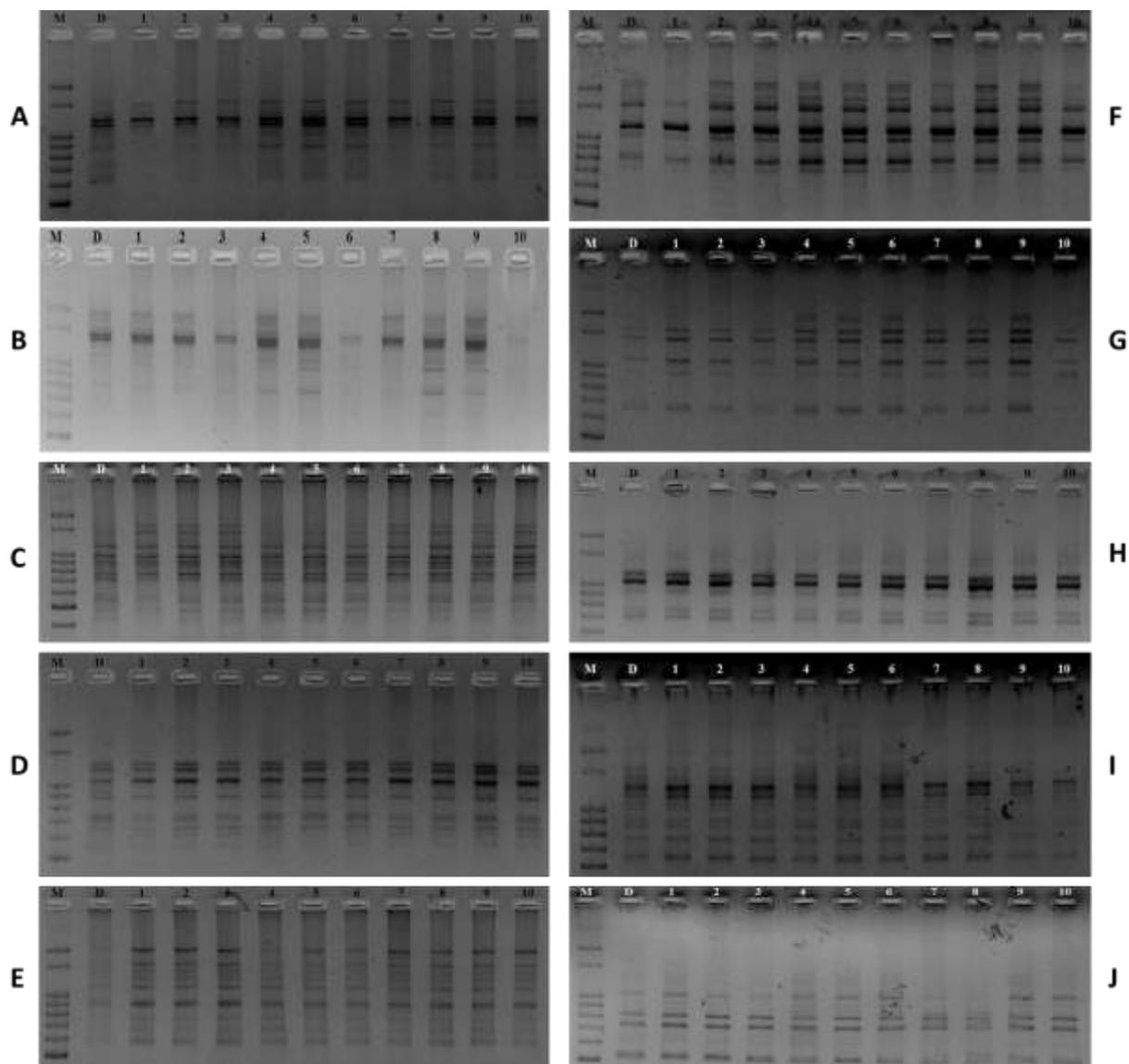


Figura 2 - Amplificações produzidas utilizando *primers* UBC 810 (A), UBC 827 (B), UBC 834 (C), UBC 841 (D), UBC 849 (E), UBC 855 (F), UBC 857 (G), UBC 859 (H), UBC 864 (I) e UBC 890 (J). M – Marcador de peso molecular; D - DNA da planta-mãe; 1 a 8 - DNA de plantas regeneradas no tratamento 3 μ M BAP; 9-10 - DNA de plantas regeneradas no tratamento 1 μ M BAP + 0,5 μ M ANA.

Dos 20 marcadores ISSR utilizados para a análise inicial, apenas 13 *primers* produziram bandas visíveis, reprodutíveis e contáveis. Estes 13 *primers* geraram 91 produtos de amplificação variando de 200 a 1000 pb. O número de bandas para cada *primer* variaram de 1 a 11, com uma média de 7 bandas por *primer* ISSR. Do total das bandas amplificadas, apenas

8 foram polimórficas, dando origem, então, a 83 monomórficas para todas as 10 plantas de crambe regeneradas comparadas com a planta doadora de explante (Tabela 9).

Tabela 9. Lista de diferentes *primers* UBC utilizados para a detecção da estabilidade genética de plantas regeneradas *in vitro* de *C. abyssinica*

UBC Primer	Sequência nucleotídeos 5'-3'	Nº de bandas monomórficas	Nº de bandas polimórficas	Total de bandas amplificadas
UBC 810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	3	1	4
UBC 827	ACACACACACACACACG	8	3	11
UBC 834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	11	0	11
UBC 841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	4	0	4
UBC 845	CTCTCTCTCTCTCTRG	2	0	2
UBC 849	GTGTGTGTGTGTGTGTYA	8	0	8
UBC 855	ACACACACACACACACYT	8	0	8
UBC 857	ACACACACACACACACYG	5	0	5
UBC 859	TGTGTGTGTGTGTGTGRC	7	0	7
UBC 864	ATGATGATGATGATGATG	9	2	11
UBC 879	CTTCACTTCACTTCA	1	0	1
UBC 889	DBDACACACACACACAC	9	0	9
UBC 890	VHVGTTGTGTGTGTGTGT	8	2	10
Número total de bandas produzidas		83	8	91

O padrão de amplificação do DNA das plantas de crambe produzidas por cultura de tecidos é mostrado nos perfis representativos do gel pelos *primers* UBC 810, 827, 834, 841, 849, 855, 857, 859, 864 e 890 (Figura 2A-J).

Os *primers* UBC 834 (Figura 2C), 841 (Figura 2D), 845, 849 (Figura 2E), 855 (Figura 2F), 857 (Figura 2G), 859 (Figura 2H), 879 e 889 desmonstraram ser totalmente monomórficos para a planta doadora e seus regenerados. Já os *primers* UBC 810 (Figura 2A), 827 (Figura 2B), 864 (Figura 2I) e 890 (Figura 2J) apresentaram polimorfismo em no máximo 3 bandas (Tabela 9). Os *primers* que apresentaram maior produto de amplificação foram o UBC 827, 834 e 864, sendo o UBC 834 totalmente monomórfico.

O perfil de bandas obtidas entre a progênie e os regenerados demonstrou elevada uniformidade nos dois tratamentos aqui testados na micropropagação de crambe, sugerindo um elevado grau de fidelidade genética. Esses resultados confirmam que as plantas de crambe micropropagadas utilizando segmentos apicais como explante mantêm a estabilidade genética,

mesmo depois de um prolongado período de 210 dias (8 subcultivos) e sob efeito de reguladores de crescimento, como BAP e ANA, além das estressantes condições do cultivo *in vitro*.

O uso de segmentos apicais ou nodais na micropropagação é um dos mais importantes métodos e tem sido empregado com sucesso em muitos cultivos de plantas (SHARMA et al., 2011; ZOGHLAMI et al., 2012), devido à sua simplicidade, seu baixo risco de instabilidade genética, e sua alta taxa de propagação (EL SAWY, 2007; RAY; BHATTACHARYA, 2010; DAS et al., 2010; SINGH et al., 2012). Embora as transferências e a longa duração *in vitro* sejam conhecidas por induzir variações somaclonais (RANI; RAINA, 2000), poucos são os dados moleculares sobre o efeito do número de subcultivos na estabilidade do material vegetal micropropagado (BORSE et al., 2011).

A cultura *in vitro* pode induzir a perda dos controles celulares causando assim as variações somaclonais (MIGUEL; MARUM, 2011; PATHAK; DHAWAN, 2012). As razões para ocorrência de variações somaclonais ainda não estão bem esclarecidas, embora fatores como tempo de cultivo (MIÑANO et al., 2009), número de subcultivos (HAMAD; TAHA, 2008; BORSE et al., 2011; SHARMA et al., 2011), fitorreguladores (BAIRU et al., 2006; BISWAS et al., 2009), tipo de explante (CHUANG et al., 2009), passagem pela fase indireta de calo (PEREDO et al., 2006), genótipo (KHAN et al., 2009), composição do meio de cultura (LUTTS et al., 1998) e o nível de ploidia e mosaicismos (NAKANO et al., 2006), sejam considerados agentes capazes de induzir essa variabilidade *in vitro*.

Os possíveis mecanismos envolvidos incluem mutações cromossômicas e pontuais, recombinação somática, trocas de cromátides irmãs, rearranjos genéticos somáticos, atividade de elementos transponíveis, repetições em tandem, instabilidade de sequências, bem como processos epigenéticos, tais como a metilação do DNA (PHILLIPS et al., 1994; MOHAN, 2001; GHEORGHE et al., 2009; MIGUEL; MARUM, 2011; PATHAK; DHAWAN, 2012).

A cultura de tecidos em crambe tem sido utilizada para propagar (LI et al., 2011; PALMER; KELLER, 2011), melhorar geneticamente (LI et al., 2013; CHHIKARA et al., 2012; LI et al., 2010), além de identificar e utilizar alguns dos seus genes para o melhoramento de outras espécies (WANG; LUO, 1998; WANG et al., 2003; WANG et al., 2004; WANG et al., 2006; MIETKIEWSKA et al., 2007). Na literatura, o uso de marcadores moleculares em crambe limita-se ao estudo da diversidade genética (WARWICK; GUGEL, 2003; LARA-FIOREZZA et al., 2013), identificação e caracterização de transformantes genéticos (LI et al., 2013; CHHIKARA et al., 2012; LI et al., 2010; XU et al., 2010; WANG et al., 2006; WANG et al., 2004; WANG et al., 1998) e para identificação de genes de

interesse (CHENG et al., 2013; ZULFIQAR et al., 2011; PAULOSE et al., 2010; MIETKIEWSKA et al., 2007). Deve-se destacar que até o presente momento não existem relatos sobre a avaliação da estabilidade genética, utilizando marcadores moleculares de DNA, em plantas de crambe regeneradas por cultivo *in vitro*.

Os *primers* ISSRs têm sido utilizados para detectar variações somaclonais em plantas micropropagadas (SINGH et al., 2013; MUTHIAH et al., 2013; VERMA et al., 2013; PATHAK; DHAWAN, 2012; BHATIA et al., 2009; BOPANA; SAXENA, 2009; HUANG et al., 2009; JOSHI; DHAWAN, 2007) e para o estudo da diversidade genética entre as cultivares e germoplasma (SHEIDAI et al., 2014; LIU, Y. et al., 2013; LIU, F. et al., 2013; WANG et al., 2013).

Com relação à estabilidade genética em regenerantes da família Brassicaceae, Leroy et al. (2001), usando ISSR, em *Brassica oleracea* var. botrytis, não encontraram polimorfismo entre os diferentes regenerantes originados a partir de embriões somáticos derivados de hipocótilo. No entanto, esses mesmos autores, observaram que em 224 calos dessa espécie, apenas seis apresentaram estabilidade genética. Qin et al. (2007) estabeleceram a embriogênese somática em *B. oleracea* var. itálica e após análise da estabilidade genética dos regenerantes com marcador molecular de DNA do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), identificando 79 bandas polimórficas a partir de 20 *primers*, resultado que, segundo os autores, demonstrou a estabilidade genética dos regenerantes. Thakur et al. (2013), inicialmente com 25 *primers* RAPD, selecionaram 15 *primers*, com um total de 72 bandas, que mostraram uma completa uniformidade genética da planta mãe com os regenerados por meio de pecíolo foliar de *B. juncea* var. NRCDR-2.

Modgil et al. (2005) relataram que a longa duração de culturas *in vitro* é um dos principais fatores que causam a variação somaclonal. No entanto, em nosso estudo, a duração da cultura por 210 dias foi considerada adequada para a obtenção de plantas regeneradas geneticamente uniformes às plantas doadoras de explante de *C. abyssinica*.

4- CONCLUSÕES

O segmento apical é um explante para a micropropagação confiável para a multiplicação de plantas *true-to-tipe*. A pequena variação genética detectada pode ser devido ao período de incubação de 210 dias, sucessivas trocas de meio e reguladores de crescimento,

induzindo variações e/ou mutações. Em todos os *primers* testados, 91,2% das bandas foram monomórfica, demonstrando estabilidade genética de *C. abyssinica* cv. FMS brilhante.

Este trabalho estabelece um protocolo para micropropagação de crambe por meio de segmentos apicais como explante, além de manter a estabilidade genética verificada utilizando marcadores ISSR. Esse protocolo de micropropagação padronizado pode ser utilizado, com uma possibilidade mínima de que qualquer variabilidade seja induzida no processo *in vitro*. Existe a necessidade de se aprimorar o processo de enraizamento e aclimatização de plantas de crambe, a fim de tornar esse protocolo passível de aplicação comercial.

5- REFERÊNCIAS

- ABDELNOOR, R.V.; BARROS, E.G. DE; MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, v. 18, p. 265-273, 1995.
- AHN, Y.J.; CHEN, G.Q. *In vitro* regeneration of castor (*Ricinus communis* L.) using cotyledon explants. **Hortscience**, v. 43, n. 1, p. 215-219, 2008.
- ANDERSON, M.D.; PENG, C.; WEISS, M.J. Crambe *Crambe abyssinica* Hochst., as a flea beetle resistant crop (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 85, p. 594-600, 1992.
- APÓSTOLO, N.M.; BRUTTI, C.B.; LLORENTE, B.E. Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 41, p. 307–313, 2005.
- ARTUS, N.N. Arsenic and cadmium phytoextraction potential of crambe compared with Indian mustard. **Journal of Plant Nutrition**, v. 29, p. 667-679, 2006.
- BAIRU, M.W.; FENNELL, C.W.; STADEN, J.V. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in *Cavendish banana* (Musa AAA cv. ‘Zelig’). **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 4, p. 347-351, 2006.
- BAIRU, M.W.; STIRK, W.A.; DOLEZAL K.; STADEN, J.V. The role of topolins in micropropagation and somaclonal variation of banana cultivars ‘Williams’ and ‘Grand Naine’ (*Musa* spp. AAA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 95, p. 373-379, 2008.
- BENNICI, A.; ANZIDEI, M.; VENDRAMIN, G.G. Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. Regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. **Plant Science**, v. 166, p. 221-227, 2004.

- BHATIA, R.; SINGH, K.P.; JHANG, T.; SHARMA, T.R. Assessment of clonal fidelity of micropropagated gerbera plants by ISSR markers. **Scientia Horticulturae**, v. 119, p. 208-211, 2009.
- BISWAS, M.K.; DUTT, M.; ROY, U.K.; ISLAMB, R.; HOSSAIN, M. Development and evaluation of *in vitro* somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits. **Scientia Horticulturae**, v. 122, n. 3, p. 409-416, 2009.
- BOPANA, N.; SAXENA, S. *In vitro* regeneration of clonally uniform plants of *Crataeva magna*: a high value medicinal tree by axillary branching method. **New Forests**, v. 38, p. 53-65, 2009.
- BORCHETIA, S.; DAS, S.C.; HANDIQUE, P.J.; DAS, S. High multiplication frequency and genetic stability for commercialization of the three varieties of micropropagated tea plants (*Camellia* spp.). **Scientia Horticulturae**, v. 120, p. 544-550, 2009.
- BORSE, N.; CHIMOTE, V.P.; JADHAV, A.S. Stability of micropropagated *Musa acuminata* cv. Grand Naine over clonal generations: a molecular assessment. **Scientia Horticulturae**, v. 129, p. 390-395, 2011.
- CAI, L.; FU, L.; JI, L. Regeneration of *Jatropha curcas* through efficient somatic embryogenesis and suspension culture. **Genetically Modified Foods**, v. 2, n. 2, p. 110-117, 2011.
- CAO, J.; EARLE, E.D. Transgene expression in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) clones propagated *in vitro* via leaf explants. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 789-796, 2003.
- CHENG, J.; SALENTIJN, E.M.J.; HUANG, B.; KRENS, F.A.; DECHESNE, A.C.; VISSER, R.G.F.; VAN LOO, E.N. Isolation and characterization of the omega-6 fatty acid desaturase (FAD2) gene family in the allohexaploid oil seed crop *Crambe abyssinica* Hochst. **Molecular Breeding**, v. 32. P. 517-531, 2013.
- CHERUVATHUR, M.K.; THOMAS, T.D. An efficient plant regeneration system through callus for *Pseudarthria viscida* (L.) Wright and Arn., a rare ethnomedicinal herb. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 17, p. 395-401, 2011.
- CHHIKARA, S.; DUTTA, I.; PAULOSE, B.; JAIWAL, P. K.; DHANKHER, O. P. Development of an *Agrobacterium*-mediated stable transformation method for industrial oilseed crop *Crambe abyssinica* 'BelAnn'. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 457-465, 2012.
- CHUANG, S.J.; CHEN, C.L.; CHEN, J.J.; CHOU, W.Y.; SUNG, J.M. Detection of somaclonal variation in micro-propagated *Echinacea purpurea* using AFLP marker. **Scientia Horticulturae**, v. 120, p. 121-126, 2009.
- DAS, A.; KESARI, V.; RANGAN, L. Plant regeneration in Curcuma species and assessment of genetic stability of regenerated plants. **Biologia Plantarum**, v. 54, p. 423-429, 2010.
- DEVARUMATH, R. M.; NANDY, S.; RANI, V.; MARIMUTHU, S.; MURALEEDHARAN, N.; RAINA, S.N. RAPD, ISSR and RFLP fingerprints as useful

markers to evaluate genetic integrity of micropropagated plants of three diploid and triploid elite tea clones representing *Camellia sinensis* (China type) and *C. assamica* ssp. *Assamica* (Assam-Indian type). **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 166-173, 2002.

DEVI, Y.S.; MUKHERJEE, B.B.; GUPTA, S. Rapid cloning of elite teak (*Tectona grandis* Linn) by *in vitro* multiple shoot production. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 32, p. 668-671, 1994.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

EL SAWY, M.A. Somaclonal variation in micro-propagated strawberry detected at the molecular level. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 5, p. 721-725, 2007.

FAISAL, M.; ALATAR, A.A.; AHMAD, N.; ANIS, M.; HEGAZY, A.K. An efficient and reproducible method for *in vitro* clonal multiplication of *Rauvolfia tetraphylla* L. and evaluation of genetic stability using DNA-based markers. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, p. 1739-1752, 2012.

FALASCA, S.L.; FLORES, N.; LAMAS, M.C.; CARBALLO, S.M.; ANSCHAU, A. *Crambe abyssinica*: an almost unknown crop with a promissory future to produce biodiesel in Argentina. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 5808-5812, 2010.

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

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. L. **Plant propagation by tissue culture: volume 1, the background**. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. 501 p.

GEORGE, P.S.; RAVISHANKER, G.A.; VENKATARAMAN, L.V. Clonal multiplication of *Gardenia jasminoides* Ellis through axillary bud culture. **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 59-62, 1993.

GHEORGHE, R.N.; VISOIU, E.; POPESCU, C.F.; PAMFIL, D. Assesment of Genetic Stability and Fidelity of Some Micropropagated *Vitis vinifera* L. "*Feteasca neagra*" Clones by Ampelometric and RAPD Markers. **Bulletin UASVM Horticulture**, v. 66, n. 1, 2009.

GHNAYA, A.B.; CHARLES, G.; BRANCHARD, M. Rapid shoot regeneration from thin cell layer explants excised from petioles and hypocotyls in four cultivars of *Brassica napus* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 92, p. 25-30, 2008.

GIRIJA, S.; GANAPATHI, A.; VENGADESAN, G. Micropropagation of *Crossandra infundibuliformis* (L.) Nees. **Scientia Horticulturae**, v. 82, p. 331-337, 1999.

GOEL, M.K.; KUKREJA, A.K.; BISHT, N.S. *In vitro* manipulations in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) for incessant and scale up micropropagation using adventitious roots in liquid medium and assessment of clonal fidelity using RAPD analysis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 96, p. 1-9, 2009.

- GOKHALE, M.; BANSAL, Y.K. Direct *in vitro* regeneration of a medicinal tree *Oroxylum indicum* (L.) Vent. through tissue culture. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 16, p. 3777-3781, 2009.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPq, 1998. v.1. p.183-260.
- GUO, D.P.; ZHU, Z.J.; HU, X.X.; ZHENG, S.J. Effect of cytokinins on shoot regeneration from cotyledon and leaf segment of stem mustard (*Brassica juncea* var. tsatsai). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 83, p. 123-127, 2005.
- HAMAD, A.M.; TAHA, R.M. Effect of sequential subcultures on *in vitro* proliferation capacity and shoot formations pattern of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) over different incubation periods. **Scientia Horticulturae**, v. 117, n. 4, p. 329-334, 2008.
- HUANG, W.J.; NING, G.G.; LIU, G.F.; BAO, M.Z. Determination of genetic stability of long-term micropropagated plantlets of *Platanus acerifolia* using ISSR markers. **Biologia Plantarum**, v. 53, p. 159-163, 2009.
- ISHIGAKI, G.; GONDO, T.; SUENAGA, K.; AKASHI, R. Multiple shoot formation, somatic embryogenesis and plant regeneration from seed-derived shoot apical meristems in ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*). **Grassland Science**, v. 55, p. 46-51, 2009.
- JORDAN, M.; OYANEDEL, E. Regeneration of *Pouteria lucuma* (Sapotaceae) plants *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 31, p. 249-252, 1992.
- JOSHI, P.; DHAWAN, V. Assessment of genetic fidelity of micropropagated *Swertia chirayita* Plantlets by ISSR marker assay. **Biologia Plantarum**, v. 51, p. 22-26, 2007.
- KALIA, R.K.; ARYA, S.; KALIA, S.; ARYA, I.D. Plantlet regeneration from fascicular buds of seedling shoot apices of *Pinus roxburghii* Sarg. **Biologia Plantarum**, v. 51, n. 4, p. 653-659, 2007.
- KHAN, E.U.; FU, X.Z.; WANG, J.; FAN, Q.J.; HUANG, X.S.; ZHANG, G.N.; SHI, J.; LIU, J.H. Regeneration and characterization of plants derived from leaf *in vitro* culture of two sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) cultivars. **Scientia Horticulturae**, v. 120, n. 1, p. 70-76, 2009.
- KMEC, P.; WEISS, M.J.; MILBRATH, B.G.; SCHATZ, J.; HANZEL, B.K.; HANSON, ERIKSMOEN, E.D. Growth analysis of crambe. **Crop Science**, v. 38, p. 108-112, 1998.
- KOROCH, A.; JULIANI, H.R.; KAPTEYN J.; SIMON, J.E. *In vitro* regeneration of *Echinacea purpurea* from leaf explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 79-83, 2002.
- LAKSHMANAN, V.; VENKATARAMAREDDY, S. R.; NEELWARNE, B. Molecular analysis of genetic stability in long term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2007.

- LARA-FIOREZEA, A.C.C.; TOMAZA, C.A.; FIOREZEA, S.L.; PILONB, C.; ZANOTTO, M.D. Genetic diversity among progenies of *Crambe abyssinica* Hochst forseed traits Industrial. **Crops and Products**, v. 50, p. 771-775, 2013.
- LEELA, T.; NARESH, B.; REDDY, M.S.; MADHUSUDHAN, N.Ch.; CHERKU, P.D. Morphological, physico-chemical and micropropagation studies in *Jatropha curcas* L. and RAPD analysis of the regenerants. **Applied Energy**, v. 88, p. 2071–2079, 2011.
- LEROY, X. J.; LEON, K.; HILY, J. M.; CHAUMEIL, P.; BRANCHARD, M. Detection of *in vitro* culture induced instability through inter-simple sequence repeat analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p. 885-891, 2001.
- LI, X.; AHLMAN, A.; LINDGREN, H.; ZHU, L.H. Highly efficient *in vitro* regeneration of the industrial oilseed crop *Crambe abyssinica*. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 170-175, 2011.
- LI, X.; AHLMAN, A.; YAN, X.; LINDGREN, H.; ZHU, L.-H. Genetic transformation of the oilseed crop *Crambe abyssinica*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 100, p. 149-156, 2010.
- LI, X.; FAN, J.; GRUBER, J.; GUAN, R.; FRENTZEN, M.; ZHU, L.-H. Efficient selection and evaluation of transgenic lines of *Crambe abyssinica*. **Frontiers in Plant Science - Plant Biotechnology**, v. 4, n. 162, p. 1-9, 2013.
- LIU, F.; GUO, Q.-S.; SHI, H.-Z.; WANG, T.; ZHU, Z.-B. Genetic diversity and phylogenetic relationships among and within populations of *Whitmania pigra* and *Hirudo nipponica* based on ISSR and SRAP markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, p. 215-223, 2013.
- LIU, Y.; ZHANG, J.-M.; WANG, X.-G.; LIU, F.; SHEN, Z.-B. Genetic diversity in *Vicia amoena* (Fabaceae) germplasm resource in China using SRAP and ISSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, p. 86-93, 2013.
- LONARDO, S.di; VACCARI, F.P.; BARONTI, S.; CAPUANA, M.; BACCI, L.; SABATINI, F.; LAMBARDI, M.; MIGLIETTA, F. Biochar successfully replaces activated charcoal for *in vitro* culture of two white poplar clones reducing ethylene concentration. **Plant Growth Regulation**, v. 69, p. 43-50, 2013.
- LUTTS, S.; KINET, J.M.; BOUHARMONT, J. NaCl impact on somaclonal variation exhibited by tissue culture-derived fertile plants of rice (*Oryza sativa* L). **Journal of Plant Physiology**, v. 152, n. 1, p. 92-103, 1998.
- MARITANO, P.F.; ALDERETE, L.M.; DE LA TORRE, M.C.P.; ESCANDÓN, A.S. *In vitro* propagation and genetic stability analysis of *Evolvulus* spp. Biotechnological tools for the exploration of native germplasm with ornamental potential. **In Vitro Cellular Development Biology – Plant**, v. 46, p. 64-70, 2010.
- MEMON, S.A.; HOU, X.; ZHU, B.; WOLUKAU, J.N. High-frequency adventitious shoots regeneration from leaf of non-heading Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*) cultured *in vitro*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 1191-1196, 2009.

MENDES, J.C.; SOARES, C.Q.G.; BRAGA, V.F.; PINTO, L.C.; SANTANA, R.; VICCINI, L.F.; PEIXOTO, P.H.P. Enraizamento *in vitro* de *Vriesea cacuminis* L.B.Smith (BROMELIACEAE) do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 969-971, 2007.

MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. *In vitro* multiplication of *Dyckia macedoi* – an endangered endemic Brazilian bromeliad. **Botanic Gardens Micropropagation News**, v. 1, n. 6, p. 70-72, 1993.

MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. *In vitro* multiplication of *Vriesea forsteriana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 30, p. 247-249, 1992.

MIETKIEWSKA, E.; BROST, J.M.; GIBLIN, E.M.; BARTON, D.L.; TAYLOR, D.C. Cloning and functional characterization of the fatty acid elongase 1 (FAE1) gene from high erucic *Crambe abyssinica* cv. Prophet. **Plant Biotechnology Journal**, v. 5, n. 5, p. 636-645, 2007.

MIGUEL, C.; MARUM, L. An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 11, p. 3713-3725, 2011.

MINAÑO, H.S.; GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; MARTÍN, C. Molecular characterization and analysis of somaclonal variation in chrysanthemum cultivars using RAPD markers. **Scientia Horticulturae**, v. 122, p. 238-243, 2009.

MODGIL, M.; MAHAJAN, K.; CHAKRABARTI, S.K.; SHARMA, D.R.; SOBTI R. C. Molecular analysis of genetic stability in micropropagated apple rootstock MM 106. **Scientia Horticulturae**, v. 104, p. 151-210, 2005.

MOHAN, J.S. Tissue culture-derived variation in crop improvement. **Euphytica**, v. 118, p. 153-166, 2001.

MONFORT, L.E.F.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; ROSSI, Z.T.T.; SANTOS, F.M. Efeito do BAP no cultivo *in vitro* de *Ocimum selloi* Benth. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 458-463, 2012.

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

MUTHIAH, J.V.L.; SHUNMUGIAH, K.P.; MANIKANDAN, R. Genetic fidelity assessment of encapsulated *in vitro* tissues of *Bacopa monnieri* after 6 months of storage by using ISSR and RAPD markers. **Turkish Journal of Botany**, v. 37, n. 6, p. 1008-1017, 2013.

NAKANO, M.; NOMIZU, T.; MIZUNASHI, K.; SUZUKI, M.; MORI, S.; KUWAYAMA, S.; HAYASHI, M.; UMEHARA, H.; OKA, E.; KOBAYASHI, H.; ASANO, M.; SUGAWARA, S.; TAKAGI, H.; SAITO, H.; NAKATA, M.; GODO, T.; HARA, Y.; AMANO, J. Somaclonal variation in *Tricyrtis hirta* plants regenerated from 1-year-old embryogenic callus cultures, **Scientia Horticulturae**, v. 110, n. 4, p. 366-371, 2006.

- PAIVA NETO, V.B.de; PAIVA, R.; FURTADO, D.E. Indução *in vitro* de raízes adventícias em explantes de salix (*Salix humboldtiana* Willdenow). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 41, n. 1, p. 82-87, 1998.
- PAIVA, P.D.O de; JOSÉ, S.C.B.R.; PASQUAL, M.; PAIVA, R. Efeito do ácido naftaleno acético e GA₃ na micropropagação de violeta. **Revista Ceres**, v. 44, n. 254, p. 392-398, 1997.
- PALMER, C.D.; KELLER, W.A. Somatic embryogenesis in *Crambe abyssinica* Hochst. Ex R.E. Fries using seedling explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 104, p. 91-100, 2011.
- PARASHARAMI, V.A.; POONAWALA, I.S.; NADGAUDA, R.S. Bud break and plantlet regeneration *in vitro* from mature trees of *Pinus roxburghii* Sarg. **Current Science**, v. 84, p. 203-208, 2003.
- PASQUAL, M.; ALVES, G.P.; DUTRA, L.F.; FINOTTI, D.R.; CHAGAS, E.A. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerina 'Poncã': concentrações do meio MS e da sacarose. **Revista Ceres**, v. 49, n. 282, p. 181-189, 2002.
- PATHAK, H.; DHAWAN, V. ISSR assay for ascertaining genetic fidelity of micropropagated plants of apple rootstock Merton 793. **In Vitro Cellular Development Biology - Plant**, v. 48, p. 137-143, 2012.
- PAUL, A.; THAPA, G.; BASU, A.; MAZUMDAR, P.; KALITA, M.C.; SAHOO, L. Rapid plant regeneration, analysis of genetic fidelity and essential aromatic oil content of micropropagated plants of Patchouli, *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. – An industrially important aromatic plant. **Industrial Crops and Products**, v. 32, 366-374, 2010.
- PAULOSE, B.; KANDASAMY, S.; DHANKHER, O.P. Expression profiling of *Crambe abyssinica* under arsenate stress identifies genes and gene networks involved in arsenic metabolism and detoxification. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 108, p. 1-12, 2010.
- PAVLOVIC, S.; ADŽIC, S.; CVIKIC, D.; ZDRAVKOVIC, J.; ZDRAVKOVIC, M. *In vitro* culture as a part of *Brassica oleracea* var. Capitata L. breeding. **Genetika**, v; 44, n. 3, p. 611-618, 2012.
- PEREDO, E.L.; REVILLA, M.A.; GARCÍA, R.A. Assessment of genetic and epigenetic variation in hop plants regenerated from sequential subcultures of organogenic calli. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, n. 10, p. 1071-1079, 2006.
- PHILLIPS, R.L.; KAEPLER, S.M.; OLHOFT, P. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA (PNAS)**, v. 91, p. 5222-5226, 1994.
- PHULWARIA, M.; RAI, M.K.; SHEKHAWAT, N.S. An Improved Micropropagation of *Arnebia hispidissima* (Lehm.) DC. and Assessment of Genetic Fidelity of Micropropagated Plants Using DNA-Based Molecular Markers. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, p. 1163-1173, 2013a.

- PHULWARIA, M.; SHEKHAWAT, N.S.; RATHORE, J.S.; SINGH, R.P. An efficient *in vitro* regeneration and *ex vitro* rooting of *Ceropegia bulbosa* Roxb.-a threatened and pharmaceutical important plant of Indian Thar Desert. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 25-29, 2013b.
- POLANCO, M.C.; RUIZ, M.L. Effect of benzylaminopurine on *in vitro* and *in vivo* root development in lentil, *Lens culinaris* Medik. **Plant Cell Reports**, v. 17, p 22-26, 1997.
- PRAMMANEE, S.; THUMJAMRAS, S.; CHIEMSOMBAT, P.; PIPATTANAWONG, N. Efficient shoot regeneration from direct apical meristem tissue to produce virus-free purple passion fruit plants. **Crop Protection**, v. 30, p. 1425-1429, 2011.
- PURKAYASTHA, J.; SUGLA, T.; SOLLETI, S.K.; PAUL, A.; SAHOO, L. Rapid *in vitro* multiplication and plant regeneration from nodal explants of *Andrographis paniculata*: a valuable medicinal plant. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 43, p. 409-414, 2008.
- PUROHIT, S.D.; SINGHVI, A. Micropropagation of *Achras sapota* through enhanced axillary branching. **Scientia Horticulturae**, v. 76, p. 219-229, 1998.
- QIN, Y., LI, H.-L.; GUO, Y.-D. High-frequency embryogenesis, regeneration of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and analysis of genetic stability by RAPD. **Scientia Horticulturae**, v. 111, p. 203-208, 2007.
- RANI, V.; RAINA, S.N. Genetic fidelity of organized meristem derived micropropagated plants: a critical reappraisal. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 36, p. 319-330, 2000.
- RAY, A.; BHATTACHARYA, S. Storage and conversion of *Eclipta alba* synseeds and RAPD analysis of the converted plantlets. **Biologia Plantarum**, v. 54, p. 547-550, 2010.
- ROSCOE, R.; RICHETTI, A.; MARANHO, E. Análise de viabilidade técnica de oleaginosas para produção de biodiesel em Mato Grosso do Sul. **Revista de Política Agrícola**, v. 16, p. 48-59, 2007.
- SHARMA, S.; PAMIDIMARRI, D.V.N.S.; ANANDA, K.G.V.; REDDY, M.P. Assessment of genetic stability in micropropagules of *Jatropha curcas* genotypes by RAPD and AFLP analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 1003-1009, 2011.
- SHEIDAI, M.; ZIAEE, S.; FARAHANI, F.; TALEBI, S.-M.; NOORMOHAMMADI, Z.; FARAHANI, Y. Infra-specific genetic and morphological diversity in *Linum album* (Linaceae). **Biologia**, v. 69, n. 1, p. 32-39, 2014.
- SHEKHAWAT, M.S.; SHEKHAWAT, N.S.; HARISH RAM, K.; PHULWARIA, M.; GUPTA, A.K. High frequency plantlet regeneration from nodal segment culture of female *Momordica dioica* (Roxb.). **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 14, p. 133-137, 2011.

SHIRANI, S.; SARIAH, M.; ZAKARIA, W.; SCALP, M.M. Induction Rate Responses to Cytokinins on Proliferating Shoot-Tips of Banana Cultivars (*Musa* spp.). **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 5, n. 2, p. 128-134, 2010.

SHUKLA, A.; SAWHNEY, V.K. Comparative regenerative ability of internodal segments of wild type and a genic male sterile line of rapeseed (*Brassica napus*) cultured *in vitro*. **Plant Science**, v. 79, p. 95-98, 1991.

SILVA, F.deA.S.E.; AZEVEDO, C.A.V.de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: **WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE**, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SILVA, R.P.da; COSTA, M.A.P.deC.; SOUZA, A.daS.; ALMEIDA, W.A.B.de. Regeneração de plantas de laranja 'Pêra' via organogênese *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 1153-1159, 2005.

SILVA, R.P.da; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.deA.A. Indução e cultivo *in vitro* de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja-azedo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 10, 2008.

SINGH, S.K.; RAI, M.K.; SAHOO, L. An improved and efficient micropropagation of *Eclipta alba* through transverse thin cell layer culture and assessment of clonal fidelity using RAPD analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 328-333, 2012.

SINGH, S.R.; DALAL, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K.; KALIA, R.K. Ascertaining clonal fidelity of micropropagated plants of *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. ex Munro using molecular markers. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-plant**, v. 49, n. 5, p. 572-583, 2013.

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

SREEDHAR, R.V.; LAKSHMANAN, V.; BHAGYALAKSHMI, N. Genetic fidelity of long-term micropropagated shoot cultures of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) as assessed by molecular markers. **Biotechnology Journal**, v. 2, p. 1007-1013, 2007.

SUGLA, T.; PURKAYASTHA, J.; SINGH, S.K.; SOLLETI, S.K.; SAHOO, L. Micropropagation of *Pongamia pinnata* through enhanced axillary branching. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 43, p. 409-414, 2007.

SUJATHA, M.; REDDY, T.P. Differential cytokinin effects on the stimulation of *in vitro* shoot proliferation from meristematic explants of castor (*Ricinus communis* L.). **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 561-566, 1998.

SUN, Y.; ZHAO, Y.; WANG, X.; QIAO, G.; CHEN, G.; YANG, Y.; ZHOU, J.; JIN, L.; ZHUO, R. Adventitious bud regeneration from leaf explants of *Platanus occidentalis* L. and genetic stability assessment. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 33-41, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2006. Fisiologia vegetal. 722 p. 3ed. Porto Alegre, Artmed.

THAKUR, A.K.; SINGH, B.K.; VERMA, V.; CHAUHAN, J.S. Direct Organogenesis in *Brassica juncea* var. NRCDR-2 and Analysis of Genetic Uniformity Using RAPD Markers. **National Academy Science Letters**, v. 36, n. 4, p. 403-409, 2013.

TONONA, G.; CAPUANAB, M.; DI MARCO, A. Plant regeneration of *Fraxinus angustifolia* by *in vitro* shoot organogenesis. **Scientia Horticulturae**, v. 87, p. 291-301, 2001.

VAN TELGEN, H.J.; VAN MIL, A.; KUNNEMAN, B. Effect of propagation and rooting condition on acclimatization of micropropagated plants. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 41, n. 4, p. 453-459, 1992.

VERMA, K.S.; KACHHWAHA, S.; KOTHARI, S.L. *In vitro* plant regeneration of *Citrullus colocynthis* (L.) Schard. and assessment of genetic fidelity using ISSR and RAPD markers. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 409-414, 2013.

VICENTE, M.A.A.; ALMEIDA, W.A.B.; CARVALHO, Z.S. Multiplicação *in vitro* e aclimação de *Vernonia condensata* Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 2, p. 176-183, 2009.

VILLA, F.; ARAÚJO, A.G.de; PIO, L.A.S.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* da amoreira-preta 'ébano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 3, p. 582-589, 2005.

WANG, C.; LI, G.-R.; ZHANG, Z.-Y.; PENG, M.; SHANG, Y.-S.; LUO, R.; CHEN, Y.-S. Genetic diversity of castor bean (*Ricinus communis* L.) in Northeast China revealed by ISSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, p. 301-307, 2013.

WANG, Y.P.; SNOWDON, R.J.; RUDLOFF, E.; WEHLING, P.; FRIEDT, W.; SONNTAG, K. Cytogenetic characterization and fae1 gene variation in progenies from asymmetric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Crambe abyssinica*. **Genome**, v. 47, p. 724-731, 2004.

WANG, Y.P.; SONNTAG, K.; RUDLOFF, E. Development of rapeseed with high erucic acid content by asymmetric somatic hybridization between *Brassica napus* and *Crambe abyssinica*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, p. 1147-1155, 2003.

WANG, Y.P.; SONNTAG, K.; RUDLOFF, E.; WEHLING, P.; SNOWDON, R.J. GISH analysis of disomic *Brassica napus*-*Crambe abyssinica* chromosome addition lines produced by microspore culture from monosomic addition lines. **Plant Cell Report**, v. 25, p. 35-40, 2006.

WANG, Y.P.; TANG, J.S.; CHU, C.Q.; TIAN, J. A preliminary study on the introduction and cultivation of *Crambe abyssinica* in China, an oil plant for industrial uses. **Industrial Crops and Products**, v. 12, p. 47-52, 2000.

WANG, Y.P.; XU, X.X., LUO, P. Effects of EMS and ⁶⁰Co on seed germination of *Crambe abyssinica* and its agronomic characters of M1 generation. **Bulletin of Botanical Research**, v. 19, p. 64-67, 1999.

WANG, Y.P.; LUO, P. Intergeneric hybridization between Brassica species and *Crambe abyssinica*. **Euphytica**, v. 101, p. 1-7, 1998.

WARWICK, S. I.; GUGEL, R. K. Genetic variation in the *Crambe abyssinica* – *C. hispanica* – *C. glabrata* Complex. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 50, p. 291-305, 2003.

XU, K.; YANG, Y.; LI, X. Ectopic expression of *Crambe abyssinica* lysophosphatidic acid acyltransferase in transgenic rapeseed increases its oil content. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 25, p. 3904-3910, 2010.

YANG, M.Z.; JIA, S.R.; PUA, E.C. High frequency regeneration from hypocotyls explants of *Brassica carinata* A. Br. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 24, p. 79-82, 1991.

ZHAO, J.; ZHANG, Q.; XIE, J.; HUNG, C.-Y.; CUI, J.; HENNY, R.J.; CHEN, J. Plant regeneration via direct somatic embryogenesis from leaf and petiole explants of *Epipremnum aureum* 'Marble Queen' and characterization of selected variants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 1, 2012.

ZOGLAMI, N.; BOUAMAMA, B.; KHAMMASSI, M.; GHORBEL, A.W. Genetic stability of long-term micropropagated *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. plantlets as assessed by molecular tools: Perspectives for *in vitro* conservation. **Industrial Crops and Products**, v. 36, p. 59-64, 2012.

ZULFIQAR, A.; PAULOSE, B.; CHHIKARA, S.; DHANKHER, O.P. Identifying genes and gene networks involved in chromium metabolism and detoxification in *Crambe abyssinica*. **Environmental Pollution**, v. 159, p. 3123-3128, 2011.

CAPÍTULO IV

ANATOMIA FOLIAR DE *Crambe abyssinica* HOCHST CULTIVADAS *IN VIVO*, *IN VITRO* E DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO

Anatomia foliar de *Crambe abyssinica* Hochst cultivadas *in vivo*, *in vitro* e durante a aclimatização

RESUMO

Crambe abyssinica é uma planta valiosa para alimentação animal, aplicação industrial e farmacêutica, produção de biodiesel, fabricação de revestimentos, detergentes, produtos de deslizamento, cosméticos, lubrificantes e nylon. Este estudo objetivou caracterizar e avaliar possíveis modificações na anatomia das folhas de crambe no ambiente *in vivo*, *in vitro* e durante a aclimatização. Também foi avaliada a anatomia das folhas durante o processo de indução de brotos a partir do protocolo de micropropagação. Os resultados da comparação das folhas *in vivo*, *in vitro* e durante a aclimatização, indicou que não houve diferença estatística quanto à espessura do limbo, mesofilo foliar, parênquima paliçádico e esponjoso, e nervura central. Houve diferença significativa nas faces adaxial e abaxial da epiderme, sendo os valores superiores encontrados na condição *in vivo*. A área do feixe vascular foi superior e significativamente diferente na condição *in vitro*. Com relação à comparação da anatomia das folhas durante o processo de indução de brotos, em meio MS com diferentes citocininas e diferentes concentrações, foi observado que aos 30 dias apenas a face adaxial da epiderme e o parênquima paliçádico apresentaram diferenças significativas com relação às concentrações testadas, independente do tipo de citocinina empregada. Aos 120 dias, as visualizações anatômicas realizadas nos mesofilos demonstraram que não existe diferença acentuada entre as citocininas a 5 μM . No entanto, a 10 μM a CIN é superior às demais citocininas. Portanto, as diversas fontes de citocininas e concentrações utilizadas neste trabalho não promoveram mudanças acentuadas, no sentido de alterar a organização e/ou a espessura em relação ao controle, e que, as alterações observadas na estrutura e espessura das folhas dos tratamentos de aclimatização prejudicaram o processo de estabelecimento da plântula *ex vitro*.

Palavras-chave: oleaginosa, micropropagação, mesofilo, histologia foliar, anatomia vegetal.

ABSTRACT

Leaf anatomy of *Crambe abyssinica* Hochst grown *in vivo*, *in vitro* and during acclimatization

Crambe abyssinica is a valuable plant for animal feed, pharmaceutical and industrial application, production of biodiesel, manufacture of coatings, detergents, slip, cosmetics, lubricants and nylon. The present study aimed to characterize and evaluate possible changes in the anatomy of the leaves of *Crambe* in the ambience *in vivo*, *in vitro* and during acclimatization. The anatomy of the leaves during the process of induction of shoots from micropropagation protocol was also evaluated. The results of the comparison of leaves *in vivo*, *in vitro* and during acclimatization, indicated that there was no statistical difference between the thickness of the leaf blade, mesophyll, palisade and spongy parenchyma, and midrib. There was a significant difference in the adaxial and abaxial epidermis, with higher values found in the *in vivo* condition. The area of vascular bundle was higher and significantly different in *in vitro* condition. The comparison of the anatomy of leaves during the induction of shoots on MS medium with different cytokinins and different concentrations was observed that at 30 days only adaxial epidermis and palisade parenchyma showed significant differences with respect to the concentrations tested, independently the type of cytokinin used. After 120 days the anatomical views held in mesophyll shown no marked difference between cytokinins to 5 μM . However, 10 μM of CIN is superior to other cytokines. Therefore, the different sources of cytokinins and concentrations used in this study did not cause marked changes in order to change the organization and/or thickness compared to control, and that changes in the structure and thickness of the leaves of treatments acclimatization hampered the process of establishing the *ex vitro* seedlings.

Key words: oilseed, micropropagation, mesophyll, leaf histology, plant anatomy.

1- INTRODUÇÃO

Crambe abyssinica é uma planta pertencente à família Brassicaceae, sendo a espécie mais importante economicamente desse Gênero com 34 representantes (MULDER; MASTEBROEK, 1996; WANG et al., 2004). Suas sementes contêm 45-50% de proteína bruta, até 35% de óleo, e este com 55-60% de ácido erúico (MULDER; MASTEBROEK, 1996; PALMER; KELLER, 2011). Tais características a tornam altamente valiosa para alimentação animal, aplicação industrial e farmacêutica, para a produção de biodiesel, fabricação de revestimentos, detergentes, produtos de deslizamento, cosméticos, lubrificantes e nylon (COOKE; KONSTANT, 1991; BONDIOLI et al., 1998; MASSOURA et al., 1998; VARGAS-LOPEZ et al., 1999; CAPELLE; TITTONEL, 1999; PALMER; KELLER, 2011).

O melhoramento genético de espécies como *C. abyssinica*, com o objetivo de aumentar a produção de óleo ou alterar algum composto de interesse, tem sido bastante utilizado (WANG; PENG, 1998; MURPHY, 1999; WANG et al., 2003; WANG et al., 2004; LI et al., 2010). No entanto, para que o melhoramento genético seja bem sucedido, etapas biotecnológicas prévias devem ser concluídas com eficiência. Para crambe, a falta de protocolos adequados para a micropropagação e a necessidade de material vegetal em grande quantidade tem dificultado o desenvolvimento de plantas transgênicas (GAO et al., 1998; LI et al., 2010), principalmente devido à baixa sobrevivência na fase final que é a aclimatização (PREECE; SUTTER, 1991).

O processo de aclimatização, ou seja, a transferência da planta do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*, é muitas vezes um passo crítico para a sobrevivência da plântula (APÓSTOLO et al., 2005). Existem grandes diferenças entre os ambientes *in vitro* e *ex vitro*, tais como, iluminação (intensidade e qualidade), umidade relativa, nutrientes, substrato e concentração gasosa (SEELYE et al., 2003). No ambiente *in vitro* existe baixa intensidade luminosa, alta umidade, presença de açúcar e reguladores de crescimento no substrato, e baixa troca gasosa, com falta de CO₂ e excesso de etileno (KADLECEK et al., 2001). Esses fatores induzem distúrbios no crescimento, desenvolvimento e morfologia, envolvendo alterações anatômicas e fisiológicas na planta (KOZAI, 1991).

O principal transtorno fisiológico, quando as plântulas são submetidas ao ambiente *ex vitro*, está relacionado ao excesso de perda de água, devido ao funcionamento inadequado dos estômatos, à deficiência de cera e cutícula na folha, e a um sistema radicular não funcional (MAJADA et al., 1998; ZOBAYED et al., 2001; APÓSTOLO et al., 2005; MATHUR et al., 2008; CHANDRA et al., 2010). As anormalidades anatômicas podem ser provenientes do

excesso de reguladores de crescimento presentes no meio de cultura (HRONKOVA et al., 2003).

Apesar das abundantes pesquisas comparando as características estruturais de plantas *in vitro* e *in vivo* (BARBOZA et al., 2006; DOUSSEAU et al., 2008; MAYER et al., 2008; FERMINO JUNIOR; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2009; BRAGA et al., 2011), existem poucos estudos sobre essas características durante o processo de indução de brotos nas sucessivas fases da micropropagação (APPEZZATO-DA-GLÓRIA et al., 1999; APÓSTOLO et al., 2005; HAZARIKA, 2006).

Além disso, poucos protocolos de micropropagação citam as etapas para aclimatização do crambe (LI et al., 2010, 2011; CHHIKARA et al., 2012), pois descrevem de forma incompleta, não permitindo sua repetibilidade. Palmer e Keller (2011) são os únicos que relataram 70% de sobrevivência nessa fase, sem, contudo, divulgar a metodologia empregada. Ainda não existem estudos anatômicos sobre *C. abyssinica* disponíveis na literatura específica.

O presente estudo objetivou caracterizar e avaliar possíveis modificações na anatomia das folhas de *C. abyssinica* no ambiente *in vivo*, *in vitro* e durante a aclimatização. Também foram avaliadas a anatomia das folhas e a morfologia das plântulas durante o processo de indução de brotos provenientes de protocolo de micropropagação.

2- MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Centro de Ciências Agrárias e no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Ciências Biológicas, ambos da Universidade Federal do Espírito Santo. Foram utilizadas sementes de *C. abyssinica* Hochst cv. FMS brilhante, safra de 2012, obtidas com a Fundação MS, localizada em Maracaju, Mato Grosso do Sul-BR.

Experimento 01

As características anatômicas das folhas de crambe foram avaliadas em plântulas cultivadas *in vivo*, *in vitro* e em plântulas durante a aclimatização. Este experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro tratamentos

constituídos por folhas de plantas *in vivo*, *in vitro* e aclimatização 01 e 02, com cinco repetições, sendo a repetição constituída por uma folha.

As plântulas do tratamento *in vivo* foram produzidas pela germinação de sementes em vasos com latossolo vermelho-amarelo distrófico corrigido com calcário, os quais foram mantidos em casa de vegetação a uma temperatura média de 29 °C. Transcorrido 30 dias, nessas condições, retiraram-se as folhas para as análises anatômicas.

No tratamento *in vitro*, as sementes de crambe foram inicialmente lavadas em água corrente com detergente neutro. Feito isso, as sementes foram transferidas para condições assépticas na câmara de fluxo laminar. Em seguida, as mesmas foram desinfestadas por imersão em solução de antibiótico contendo Penicilina (10 mg L⁻¹) e Rifampicina (10 mg L⁻¹) por 30 minutos (min), seguido por álcool 70% por 1 min, hipoclorito de sódio comercial 50% (cloro ativo: 2-2,5%) por 30 min, e lavadas três vezes em água destilada autoclavada. O meio de cultura utilizado foi o MS^{1/2} (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e o pH do meio ajustado para 5,8 e, em seguida, autoclavado a 1,1 atm, 121 °C, por 20 min. As sementes foram inoculadas em tubos de ensaios de 25x150 mm, contendo 10 mL do meio, e incubadas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro), sob lâmpadas fluorescentes fornecendo 25,2 µmol m⁻² s⁻¹ de fluxos de fótons fotossintéticos, e temperatura de 25±1 °C. Após 30 dias em sala de crescimento, folhas foram coletadas para análises.

As plantas utilizadas para a aclimatização foram provenientes de um processo de micropropagação durante 120 dias (experimento 02). Após esse período, o primeiro processo de aclimatização foi transferir do tubo de ensaio para frascos maiores (80x150 mm) fechados com meio de cultura MS^{1/4}, com 7,5 g L⁻¹ de ágar, sem adição de sacarose e mantidas nas condições de sala de crescimento descritas no tratamento *in vitro*. A avaliação e a retirada de folhas foram efetuadas após 30 dias nestas condições (Aclimatização 1). O segundo passo da aclimatização foi manter as plântulas nos frascos fechados com substrato comercial autoclavado (Vivato Slim®), nutridas com solução de MS sem sacarose, e mantidas em local com luz e temperatura ambiente. As avaliações e a retirada de folhas foram efetuadas após 30 dias nestas condições (Aclimatização 2). Após essa etapa, as plantas foram transferidas para copos de plástico (180 ml), com o mesmo solo e condições de casa de vegetação descritas para o tratamento *in vivo*. O solo foi autoclavado e nutrido com solução de macro e micronutrientes do meio MS, sendo irrigado sempre que necessário, para manter a umidade. Contudo, após 10 dias, as plantas não sobreviveram a esta condição, sem a possibilidade de uma nova avaliação.

Experimento 02

Neste experimento, além das características anatômicas das folhas, também foram avaliadas as características morfológicas das plântulas de crambe durante a fase de brotação da micropropagação. Os brotos foram induzidos com as citocininas 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (CIN) e thidiazuron (TDZ), durante 120 dias de cultivo.

As sementes de crambe foram germinadas nas mesmas condições descritas para o experimento 01. Após 30 dias, os segmentos apicais, das plântulas normais obtidas, foram retirados e utilizados como explantes no processo de indução e subcultivos de brotos. O experimento foi conduzido em esquema fatorial 3x3, tendo no fator citocinina três níveis (BAP, CIN e TDZ), e no fator concentração três níveis (0, 5 e 10 μM), em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo a repetição constituída por dez tubos de ensaio de 25x150 mm com um explantes cada, e 10 mL de meio de cultura.

O meio de cultura utilizado foi o MS, suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, 0,5 mg L^{-1} de nitrato de prata (AgNO_3) (LI et al., 2010), 7,0 g L^{-1} de ágar, e o pH aferido para 5,8. Os tubos foram autoclavados e acondicionadas nas condições de sala de crescimento já descritas. As avaliações morfológicas quanto ao número de brotos por explante (NBE), comprimento médio dos brotos (CMB) e porcentagem de sobrevivência (%SOB) foram realizadas nos tempos 30, 60, 90 e 120 dias. A retirada de folhas por tratamento para as análises anatômicas foram realizadas nos tempos 30 e 120 dias.

Análise Anatômica

As análises anatômicas foram realizadas em cinco folhas mais desenvolvidas de cada tratamento, sendo analisadas na região da nervura central e área internervural. As amostras foram fixadas em FAA₅₀ (JOHANSEN, 1940), por 48 horas, estocadas em álcool etílico a 70%, e, posteriormente, submetidas à desidratação em série etílica crescente (70%, 90%, 95% e 100%) e incluídas em hidroxietilmetacrilato (Leica®, Alemanha). Os blocos foram cortados transversalmente com auxílio de micrótomo rotativo, com espessura variando de 8 a 10 μm . Os cortes foram corados com azul de toluidina a 0,05% em tampão acetato, pH 4,3 (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964) e montados entre lâmina e lamínula em resina sintética Entellan®. Foram realizadas medições das espessuras do limbo, mesofilo, face adaxial e abaxial da epiderme, parênquima paliçádico, parênquima esponjoso e região da nervura central. Foi mensurada também a área de tecido vascular da nervura central. As observações e mensurações foram realizadas em microscópio Nikon E200 com câmera digital

acoplada, conectado a um computador com o software Tsview® (China). A fotodocumentação foi feita em fotomicroscópio Nikon 50i (Nikon, Japão). O delineamento para as avaliações anatômicas foi inteiramente casualizado, composto por cinco repetições por tratamento, sendo a repetição constituída por uma folha e cada repetição constituída pela média de três lâminas com oito cortes cada.

Análise Estatística

Todos os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, depois de verificadas a normalidade e homogeneidade. Depois de verificada a significância dos tratamentos, foi aplicado o teste de média de Tukey, adotando-se 1 e 5% de probabilidade pelo software Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2009). A análise de regressão em função das citocininas e dos tempos de análise foram realizadas com o software Sigma Plot 10.0 (2006). Contudo, nenhuma das variáveis avaliadas se ajustou ao modelo linear, com base na significância dos coeficientes de regressão e coeficiente de determinação (R^2), adotando-se 5% de probabilidade pelo teste F, levando também em consideração o fenômeno biológico em estudo. Por esse motivo, o teste de média de Tukey foi também empregado no fator quantitativo para embasar a discussão do trabalho.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Descrição Anatômica Geral

A folha de *Crambe abyssinica* é anfiestomática, com epiderme unisseriada constituída por células de formato e tamanhos variados, recoberta com cutícula delgada. Tricomas glandulares e tectores ocorrem esparsos em ambas as faces da epiderme (dados não apresentados). O mesofilo é dorsiventral, formado por uma a duas camadas celulares de parênquima paliçádico e parênquima esponjoso com três a quatro camadas de células. Feixes vasculares do tipo colateral, de pequeno porte, ocorrem ao longo do mesofilo. A nervura central, em secção transversal, mostra-se côncavo-convexa, com epiderme formada por células arredondadas. O sistema vascular é predominantemente formado por um único feixe vascular colateral (Figura 1).

A anatomia foliar de *C. abyssinica* é semelhante àquela descrita para outros representantes de Brassicaceae, tais como *Brassica napus* L. (colza), *Brassica gravinae* Ten.,

Brassica rapa L. (nabo), *Raphanus sativus* L. (rabanete), *Diplotaxis tenuifolia* (UENO, 2011) e *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (BOEGER; POULSON, 2006), esta última com a diferença de apresentar o mesofilo sem diferenciação entre parênquima paliçádico e esponjoso.

Experimento 01

Comparando-se a anatomia do limbo de plantas cultivadas *in vivo*, *in vitro*, como durante a aclimatização, verificou-se que as folhas submetidas à aclimatização 01 e 02 apresentaram epiderme com células com aspecto desidratadas (Figuras 1C, D, G e H). Tal fato deve-se provavelmente à mudança de umidade ocasionada pela troca do tubo de ensaio para frascos maiores. Segundo Seelye et al. (2003), a perda de água pelas células recentemente transferidas da condição *in vitro* é um sintoma precoce de adaptação inadequada da planta a esta nova condição.

As plântulas cultivadas *in vitro* demonstraram ausência (ou deposição reduzida) de cutícula, em ambas as superfícies, em comparação com as cultivadas *in vivo* e durante a aclimatização (Figuras 1A e B). A ausência ou redução na camada de cutícula em folhas de plântulas cultivadas sob condições *in vitro* está, aparentemente, relacionada com a alta umidade dentro do tubo de ensaio (BATAGIN-PIOTTO et al., 2012) e a menor intensidade de luz (CALVETE et al., 2002). É importante salientar que a cutícula é extremamente importante para o processo de aclimatização das plântulas, uma vez que ajuda a controlar a transpiração e as perdas passivas de água (TAIZ; ZEIGER, 2006).

O parênquima paliçádico no tratamento *in vivo* e *in vitro* foi, em geral, constituído por uma camada de células, mas em alguns pontos encontravam-se duas camadas celulares. Sendo que as células desta região se apresentavam mais alongadas na condição *in vivo* e mais justapostas *in vitro* (Figuras 1A e B), possivelmente devido à baixa intensidade luminosa que ocasionou um investimento maior no número de células *in vitro*. Porto et al. (2014), trabalhando com *Tabebuia roseoalba* (ipê branco - Bignoniaceae), relataram que as plantas *in vivo* apresentavam parênquima paliçádico mais alongado e justaposto que na condição *in vitro*. Segundo Lee et al. (2000), células paliçádicas mais alongadas constituem uma adaptação das plantas à alta intensidade luminosa, o que explica as folhas *in vivo* apresentarem maiores valores que as folhas *in vitro*.

O parênquima esponjoso das plântulas cultivadas *in vivo* apresentou de 4 a 5 camadas de células e espaços intercelulares maiores que *in vitro*, observando de 3 a 4 camadas de células (Figuras 1A e B).

Na aclimatização (testes 01 e 02) os parênquimas demonstraram perda de células e desarranjo de sua estrutura nos diferentes substratos (Figuras 1C, D, G e H). O estresse hídrico das plantas é geralmente o maior problema durante o processo de aclimatização. Uma planta, embora aparentemente perfeita *in vitro*, apresenta alterações e deficiências anatômicas que dificultam o controle da transpiração, induzindo a uma rápida perda de água (BARBOZA et al., 2006).

Na nervura central da região mediana do limbo foliar, o sistema vascular foi constituído normalmente por um feixe vascular cilíndrico, podendo apresentar mais de um (Figuras 1E-H).

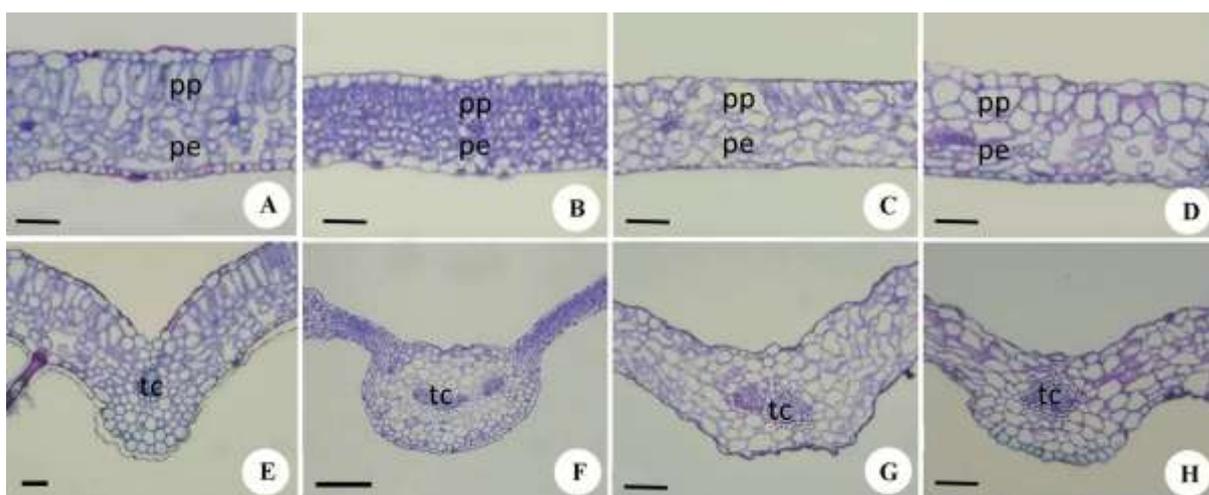


Figura 1 – Secção transversal do mesofilo (A-D) e da nervura central (E-H) de folhas de *C. abyssinica* *in vivo* (30 dias) (A e E), *in vitro* (30 dias) (B e F) e durante a aclimatização 01 (30 dias) (C e G) e 02 (60 dias) (D e H). pp - parênquima paliçádico; pe - parênquima esponjoso; tc - tecido vascular. Barra (—) = 100 μ m.

De acordo com a porcentagem de sobrevivência antes da aclimatização (testes 01 e 02), ou seja, após 120 dias de cultivo *in vitro*, as plântulas de crambe apresentaram em média 99,1% de sobrevivência. As plântulas transferidas para o tratamento 01, após 30 dias nestas condições, apresentaram uma taxa de sobrevivência média de 93,3%, e no teste 02, por mais 30 dias, apresentaram melhores taxas de sobrevivência, atingindo 100%. No entanto, após

serem transferidas para copos plásticos transparentes com solo e levadas para casa de vegetação, não houve sobrevivência após 10 dias nessas condições.

Chirinéa et al. (2012), trabalhando com plantas de *Ficus carica* cv. “Roxo de Valinhos” (figueira comum – Moraceae), obtiveram bons resultados com uma pré-aclimatização *in vitro*, assim como foi executado neste trabalho com crambe. Esses autores obtiveram 95% de sobrevivência com substrato comercial em casa de vegetação após terem realizado uma pré-aclimatização por 60 dias com meio WPM sem reguladores de crescimento. Pereira e Fortes (2001), seguindo o mesmo procedimento de pré-aclimatização, obtiveram resultados positivos em macieira “M.111” e “Marubakaido” (Rosaceae), com uma média de 90% de taxa de sobrevivência para os tratamentos mantidos durante 12, 15, 21 e 30 dias sob condições *in vitro*.

Apesar da taxa de sobrevivência nula após a transferência para solo e casa de vegetação, os melhores resultados obtidos com substrato comercial são devidos, provavelmente, ao fato deste conter a quantidade apropriada de nutrientes para o desenvolvimento das plântulas, o que apesar de todos os cuidados não foi adequado no solo.

Na Tabela 1 está representada a comparação entre as características anatômicas avaliadas nas folhas de crambe. Observa-se que não houve diferença estatística quanto à espessura do limbo e do mesofilo foliar, sendo os maiores valores em plantas estabelecidas nas condições *in vivo* (176,49 e 136,01 μm , respectivamente). Em relação às espessuras nos tecidos do mesofilo, não houve diferenças significativas no parênquima paliçádico e no esponjoso. A espessura do parênquima paliçádico foi maior nas folhas cultivadas *in vivo* (62,92 μm) e no parênquima esponjoso o maior valor foi na aclimatização 01 (84,49 μm).

Tabela 1. Espessura média (μm) do limbo, mesofilo, face adaxial e abaxial da epiderme, parênquima paliçádico e esponjoso, nervura central e área do feixe vascular (μm^2) de folhas de *C. abyssinica*, obtidas pela germinação *in vivo* (30 dias), *in vitro* (30 dias) e durante a aclimatização 01 (30 dias) e 02 (60 dias)

Tratamentos	Limbo	Mesofilo	Face adaxial	Face abaxial	Parênquima paliçádico	Parênquima esponjoso	Nervura central	Feixe vascular
<i>In vivo</i>	176,49 a	136,01 a	21,05 a	16,40 a	62,92 a	72,56 a	282,27 ab	4490,24 b
<i>In Vitro</i>	155,04 a	121,81 a	15,99 b	14,77 a	47,43 a	75,81 a	414,44 a	20066,43 a
Aclim. 01	146,14 a	124,21 a	11,77 c	10,65 b	43,38 a	84,49 a	251,71 b	9387,69 b
Aclim. 02	147,28 a	122,08 a	14,50 bc	11,13 b	50,66 a	76,38 a	267,20 ab	8900,00 b
Média Geral	156,24	126,03	15,83	13,24	51,10	77,31	303,91	10711,09
CV (%)	13,38	14,76	12,61	13,97	22,60	17,10	29,35	49,52

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Resultados semelhantes foram relatados por Batagin-Piotto et al. (2012), trabalhando com *Bactris gasipaes* (Arecaceae). Os dados encontrados também concordam com outros estudos sobre aclimatização de plantas micropropagadas, como *Fragaria ananassa* Duch. (Rosaceae) (CALVETE et al., 2002) e *Quercus suber* L. (Fagaceae) (ROMANO; MARTINS-LOUCAO, 2003), que relataram menor diferenciação do mesofilo, espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso, além de espaços intercelulares menores, que são modificações frequentemente observadas em folhas de plantas *in vitro*, quando comparadas com plantas *in vivo*. Romano e Martins-Loucao (2003), também trabalhando com um híbrido de eucalipto (*Eucalyptus grandis* W. Hill ex. Maiden \times *E. urophylla* S.T. Blake), encontraram resultados semelhantes ao deste trabalho, ocorrendo aumento na diferenciação e na espessura dos tecidos com a aclimatização.

Nas faces adaxial e abaxial da epiderme (Tabela 1), houve diferença significativa quanto a sua espessura. Novamente valores superiores foram encontrados na condição *in vivo*. Na face adaxial, o valor nesta condição (21,05 μm) foi estatisticamente superior, seguida do tratamento *in vitro* (15,99 μm). Já na face abaxial, o valor da condição *in vivo* foi de 16,40 μm , seguido mais uma vez da condição *in vitro* (14,77 μm), sem, contudo, diferenciar estatisticamente.

Com relação à nervura central, sua espessura foi maior na condição *in vitro* (414,44 μm), sem diferenciar significativamente da condição *in vivo* (282,27 μm) e aclimatização 02 (267,20 μm) (Tabela 1). De acordo com Alves e Angyalossy-Alfonso (2000), os fatores ambientais afetam as dimensões e até mesmo o arranjo dos elementos vasculares, na tentativa

de garantir um aumento na segurança do transporte, quando a planta está sujeita a algum tipo de estresse.

A área do feixe vascular foi superior e significativamente diferente na condição *in vitro* (20066,43 μm^2) (Tabela 1). Destaca-se que, apesar de não ter sido observado diferença estatística, os valores encontrados no material aclimatizado (testes 01 e 02) são extremamente superiores ao da condição *in vivo*, o que demonstra uma tentativa de superar algum tipo de estresse, quer seja hídrico ou nutricional. Outro fator importante é que no tratamento *in vivo* a presença de mais de um feixe vascular na nervura central não foi tão frequente quanto nas condições *in vitro* e durante a aclimatização, o que também explica valores superiores nessas condições. Ao contrário do observado para crambe, os feixes vasculares das plantas cultivadas *in vitro* e aclimatizadas foram mais reduzidos que o da planta *in vivo* em folhas de *Rollinia mucosa* (Annonaceae), nas quais o sistema vascular apresentou um reduzido número de elementos condutores (ALBARELLO et al., 2001). A redução do tecido vascular, especialmente o xilema, é uma característica típica de plantas de ambientes úmidos (MAYER et al., 2008), como é o caso do ambiente *in vitro*. Constatou-se que as folhas de crambe tiveram seus maiores valores com relação à área do feixe vascular nas condições *in vitro* e aclimatização.

Diversos estudos histológicos demonstraram que os órgãos vegetativos de plantas desenvolvidas *in vitro* apresentam tecidos e estruturas pouco diferenciadas se comparados com plantas cultivadas em casa de vegetação (APÓSTOLO et al., 2005; LOURO et al., 2003). Na anatomia foliar das plantas de crambe cultivadas *in vivo* e *in vitro*, observou-se haver pouca diferença entre suas estruturas, embora o número de células do mesofilo seja maior no ambiente *in vitro*.

O conhecimento das alterações morfológicas de plantas desenvolvidas *in vitro*, é fundamental para o estabelecimento de protocolos eficazes à sobrevivência de plantas oriundas de ambientes controlados para as condições naturais (DOUSSEAU et al., 2008). Devido a esse motivo, buscou-se realizar o experimento 2 a fim de conhecer as diferenças anatômicas entre plântulas de crambe no processo de micropropagação sob o efeito de diferentes citocininas e concentrações testadas em um ambiente *in vitro*.

Experimento 02

A porcentagem de sobrevivência das plântulas oriundas dos quatro subcultivos não diferiu estatisticamente entre os tratamentos, variando de 100% nos tempos de avaliação 30,

60 e 120 dias, e de 96,66% aos 90 dias. Esses resultados discordam daqueles obtidos por Pennell (1987), o qual relata que, quanto maior o número de subcultivos na micropropagação, menor será a taxa de sobrevivência. Pode-se destacar, com esse resultado, que a utilização de segmentos apicais obtidos de plântulas germinadas *in vitro*, em crescimento ativo, é preferível para o estabelecimento de um processo de micropropagação, visto que os explantes apresentam altíssimas taxas de sobrevivência com o passar dos subcultivos. A oxidação, contaminação e, porventura, a morte do explante, são problemas para o estabelecimento *in vitro* de algumas espécies em função de suas características peculiares (SATO et al., 2001).

A indução de brotos em crambe foi mais influenciada significativamente pelas concentrações testadas do que propriamente pelos tipos de citocininas utilizadas. O resumo da análise de variância para número de brotos por explante (NBE) e comprimento médio dos brotos (CMB) após 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo *in vitro* está na Tabela 2. Para o NBE, esta análise não demonstrou significância nas interações entre os fatores citocinina e concentração, em todos os tempos de avaliação. No fator citocinina, apenas aos 30 dias de cultivo foi encontrada significância (Tabela 3). Para o fator concentração, a significância foi encontrada aos 60, 90 e 120 dias (Tabela 4).

Na Tabela 2, verificou-se também que o CMB acompanhou a tendência do NBE, em que as concentrações testadas influenciaram mais que os tipos de citocininas. Com relação ao fator concentração, este apresentou significância aos 30, 60 e 90 dias (Tabela 5). Houve interação significativa entre os fatores testados apenas aos 120 dias (Tabela 6).

Para as variáveis morfológicas avaliadas em crambe, nota-se que houve pouca diferença entre as citocininas BAP, CIN e TDZ, influenciando de modo semelhante o desenvolvimento de novos brotos e seu crescimento. As diferenças no fator concentração mostram a necessidade da citocinina no meio de cultura nas concentrações testadas para estimular a brotação em segmentos apicais de crambe.

Tabela 2. Resumo da análise de variância para número de brotos por explante (NBE) e comprimento médio dos brotos (CMB) de plantas de *C. abyssinica* após 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo com diferentes citocininas e concentrações

FV	GL	Teste F							
		NBE				CMB			
		30d.	60d.	90d.	120d.	30d.	60d.	90d.	120d.
Citocinina	2	0,17 ^{ns}	1,20 ^{ns}	3,98*	0,10 ^{ns}	1,33 ^{ns}	0,28 ^{ns}	1,49 ^{ns}	3,99*
Concentração	2	2,23 ^{ns}	28,26**	19,49**	38,97**	4,91*	4,62*	0,01*	10,60**
Int. A x B	4	0,58 ^{ns}	0,87 ^{ns}	1,25 ^{ns}	0,38 ^{ns}	0,39 ^{ns}	0,93 ^{ns}	1,32 ^{ns}	2,82*
Resíduo	36	-	-	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	10,08	7,56	9,56	8,52	33,71	31,90	31,21	28,59
CV (%)	-	29,47	31,51	24,40	26,14	22,09	25,66	19,13	15,54

**, * significativos a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente;

ns: não significativo;

CV(%): coeficiente de variação em porcentagem.

No NBE aos 90 dias (Tabela 3) no fator citocinina, a BAP apresentou valores superiores (10,46), sem diferenciar estatisticamente do TDZ (10,03). Assim, a aplicação da BAP ou do TDZ, nas concentrações testadas, proporcionou aumento significativo na indução de brotações em relação a CIN. A produção de segmentos nodais é uma variável importante na propagação *in vitro* de crambe, pois reflete a produção de novas plantas a cada subcultivo. De acordo com Flores et al. (2009), a BAP é a citocinina mais eficaz para a multiplicação de partes aéreas da maioria das espécies. Furtado et al. (2007) descreveram que o TDZ e a BAP induziram uma maior formação de brotos no explante gema cotiledonar em todos os tratamentos em amendoim (*Arachis hypogaea* – Fabaceae), apresentando médias superiores ao da CIN. Marino e Bertazza (1990), ao induzir uma micropropagação em Kiwi (*Actinidia deliciosa* – Actinidiaceae) utilizando as citocininas BAP, CIN e zeatina, obtiveram uma maior proliferação de brotos ao se utilizar o BAP. Grattapaglia e Machado (1998) indicaram que a maior eficiência do BAP em relação à CIN pode estar na capacidade dos tecidos vegetais metabolizarem os reguladores de crescimento sintéticos mais rapidamente do que hormônios vegetais. Segundo os autores, isso pode variar em função da espécie de planta utilizada. Krikorian (1991) comenta que o BAP tem sido mais utilizado atualmente que as citocininas CIN e TDZ por ser um composto mais ativo, que se encontra facilmente e com custo razoável.

Tabela 3. Média do número de brotos por explante de plântulas de *C. abyssinica* em diferentes citocininas após 90 dias de cultivo *in vitro*

Citocininas	Médias
BAP	10,46 a
CIN	8,20 b
TDZ	10,03 ab

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Nas concentrações testadas das citocininas, os maiores valores de NBE foram em 5 μM (Tabela 4), sendo aos 60 dias (10,43) estatisticamente superior as demais. Aos 90 dias, a concentração de 5 μM (11,26) não diferenciou estatisticamente de 10 μM (10,93), o que se manteve aos 120 dias, apresentado 10,96 para 5 μM e 10,20 para 10 μM . Em todos os casos, os menores valores foram observados no controle, com ausência de regulador de crescimento, demonstrando a importância de uma citocinina exógena para estimular as brotações no processo de micropropagação de crambe. Nesse sentido, segundo Grattapaglia e Machado (1998), a escolha do tipo de citocinina e sua concentração são fatores que influenciam no sucesso da multiplicação *in vitro*, indispensáveis durante o processo de superação da dominância apical e indução da proliferação de gemas axilares. Desse modo, a concentração de 5 μM das citocininas testadas é suficiente para induzir uma eficiente brotação em explantes apicais de crambe.

Tabela 4. Média do número de brotos por explante de plântulas de *C. abyssinica* em diferentes concentrações de citocininas após 60, 90 e 120 dias de cultivo *in vitro*

Concentração (μM)	Dias		
	60	90	120
0	4,00 c	6,50 b	4,40 b
5	10,43 a	11,26 a	10,96 a
10	8,26 b	10,93 a	10,20 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

De modo geral, a adição de citocinina ao meio nutritivo reduziu o comprimento médio das brotações (CMB) aos 30, 60 e 90 dias (Tabela 5), contudo sem apresentar grandes diferenças estatísticas. Na avaliação aos 30 e 60 dias, a concentração de 5 μM (30,45 mm) e 10 μM (27,07 mm) apresentaram os menores valores, respectivamente, sem diferenciar estatisticamente. Aos 90 dias, não houve diferença entre as concentrações utilizadas. De forma semelhante, Nicoloso et al. (2001) verificaram que as plantas cultivadas em meio MS não suplementado com reguladores de crescimento apresentaram morfologia similar às plantas matrizes, ou seja, apresentando crescimento normal.

Tabela 5. Média do comprimento de brotos por explante (mm) de plantas de *C. abyssinica* em diferentes concentrações de citocininas após 30, 60 e 90 dias de cultivo *in vitro*

Concentração (μM)	Dias		
	30	60	90
0	38,53 a	36,10 a	31,33 a
5	30,45 b	32,54 ab	31,00 a
10	32,15 ab	27,07 b	31,31 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

A avaliação do CMB aos 120 dias de cultivo apresentou interação significativa entre os níveis dos fatores citocininas e concentrações (Tabela 6). O comprimento dos brotos foi menor em meio com ausência de citocinina quando comparado aos tratamentos com 5 e 10 μM . Esse resultado inverso ao observado para as avaliações anteriores (30, 60 e 90 dias) está relacionado ao fato da cultura ser mantida muito tempo *in vitro*, com vários subcultivos e sem adição de reguladores de crescimento, tendendo, assim, a estagnar seu crescimento ou senescer. Hartmann et al. (2002) relatam que sem adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura não seria possível promover, inibir, ou, ainda, modificar o crescimento do vegetal quando cultivados *in vitro*.

Para CMB, as concentrações de 5 e 10 μM testadas para as citocininas BAP (27,31 e 27,70 mm, respectivamente) e TDZ (34,36 e 34,18 mm, respectivamente) não demonstraram diferença significativa aos 120 dias de cultivo (Tabela 6). Para CIN, houve diferença nessas concentrações (25,14 e 34,53 mm, respectivamente), obtendo assim o maior valor de comprimento médio do broto aos 120 dias com 10 μM . Em uma concentração elevada por

períodos longos de incubação dos explantes, como é o caso deste trabalho, na presença da BAP ou TDZ ocorre uma maior inibição do crescimento dos brotos e um aumento no tamanho das folhas do que com a CIN (FURTADO et al., 2007).

Entre as citocininas testadas, a diferença encontrada no CMB aos 120 dias foi na concentração 5 μM (Tabela 6), com o TDZ (34,36 mm) apresentando valores superiores as demais citocininas, BAP (27,31 mm) e CIN (25,14 mm). Corroborando com os dados aqui apresentados, Flores et al. (2009) relataram efeito positivo do TDZ no crescimento das brotações *in vitro*. O TDZ também induziu brotos pouco alongados em guandu (*Cajanus cajan* L.- Fabaceae) (EAPEN et al., 1998). Segundo Pattnaik et al. (1996), concentrações inferiores a 5 μM de BAP e 1 μM de TDZ são eficientes para a proliferação e crescimento de brotos *in vitro*, no entanto teores mais elevados reduzem o comprimento dos brotos, o tamanho das folhas e inibem o enraizamento.

Tabela 6. Média do comprimento de brotos por explante (mm) de plantas de *C. abyssinica* em diferentes citocininas e concentrações após 120 dias de cultivo *in vitro*

Citocininas	Concentração (μM)		
	0	5	10
BAP	24,69 aA	27,31 aB	27,70 aA
CIN	24,69 bA	25,14 bB	34,53 aA
TDZ	24,69 bA	34,36 aA	34,18 aA

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Li et al. (2010), trabalhando com hipocótilos de *C. abyssinica* cv. Galactica, descreveram um protocolo de indução direta de brotos em meio MS suplementado com 10 μM de TDZ e 2,7 μM de ANA, promovendo frequência de regeneração até 60%. Em um novo trabalho, Li et al. (2011) obtiveram 95% de regeneração de brotos a partir de segmentos de hipocótilo, utilizando o meio Lepiovre suplementado novamente com 10 μM de TDZ, 2,7 μM ANA. Chhikara et al. (2012) demonstraram que a regeneração de brotos a partir de calos do hipocótilo de crambe apresenta maior eficiência no meio com 8,8 μM de BAP e 0,10 μM de ANA, com uma frequência de 70%. No presente trabalho, apesar de ter sido utilizado um explante diferente dos trabalhos acima relatados com crambe, notou-se que as concentrações

das citocininas utilizadas foram próximas, e que promoveram de forma eficiente a resposta morfogênica esperada.

Nos protocolos anteriormente publicados, a regeneração *in vitro* de crambe foi conseguida por meio da utilização de hipocótilos como explante, para viabilizar estudos relacionados ao melhoramento genético da espécie como a transgenia e a hibridização somática (WANG et al., 2004; WANG et al., 2003; WANG; PENG, 1998). Todavia, estudos relacionados à indução de brotos e regeneração de plantas inteiras a partir de segmento apical ainda não foram descritos.

Com relação às características anatômicas foliares avaliadas aos 30 dias (Tabela 7) nas plântulas cultivadas em meio MS com diferentes citocininas em diferentes concentrações, foi observado que pela análise de variância não houve interação significativa entre os fatores empregados. As diversas fontes de citocininas x concentrações utilizadas neste trabalho não promoveram efeitos significativos sobre a espessura do limbo, mesofilo, face abaxial da epiderme, parênquima esponjoso, nervura central e a área do feixe vascular das folhas de crambe aos 30 dias de cultivo. Apenas a face adaxial da epiderme e o parênquima paliçádico apresentaram diferenças significativas com relação às concentrações testadas independente do tipo de citocinina empregada.

Tabela 7. Resumo da análise de variância para a espessura (μm) do limbo, mesofilo, face adaxial e abaxial da epiderme, parênquima paliçádico e esponjoso, nervura central e área (μm^2) do feixe vascular de folhas de *C. abyssinica*, obtidas pelo cultivo *in vitro* com diferentes citocininas e concentrações após 30 dias

FV	GL	Teste F							
		Limbo	Mesofilo	Face adaxial	Face abaxial	Parênquima paliçádico	Parênquima esponjoso	Nervura central	Feixe vascular
Citocinina	2	1,10 ^{ns}	1,06 ^{ns}	1,44 ^{ns}	1,65 ^{ns}	0,70 ^{ns}	1,19 ^{ns}	1,14 ^{ns}	1,67 ^{ns}
Concentração	2	2,80 ^{ns}	2,70 ^{ns}	3,77*	0,82 ^{ns}	4,74*	1,38 ^{ns}	0,65 ^{ns}	0,73 ^{ns}
Int. A x B	4	0,53 ^{ns}	0,64 ^{ns}	0,38 ^{ns}	0,46 ^{ns}	0,28 ^{ns}	0,74 ^{ns}	0,36 ^{ns}	0,47 ^{ns}
Resíduo	36	-	-	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	139,49	106,21	18,50	15,30	36,82	71,88	381,28	14442,44
CV (%)	-	42,10	44,83	30,85	40,92	46,36	46,87	38,46	90,68

**, * significativos a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente;

ns: não significativo;

CV(%): coeficiente de variação em porcentagem.

A espessura da face adaxial e do parênquima paliçádico das folhas de crambe cultivadas *in vitro* com diferentes concentrações de citocininas aos 30 dias está representada na Tabela 8.

A espessura da face adaxial e do parênquima paliçádico apresentaram comportamento

semelhante, em que seu maior valor foi na concentração de 0 μM (21,69 e 47,74 μm , respectivamente), diferenciando estatisticamente de 5 μM (16,16 e 29,68 μm , respectivamente), encontrado os menores valores. O uso das citocininas no meio de cultivo pode induzir a produção de células com tamanho reduzido durante a divisão celular (PEREIRA et al., 2000), explicando a redução da espessura da face adaxial e do parênquima paliçádico nos meios de cultivo que continham citocinina exógena em relação ao controle.

Tabela 8. Espessura média (μm) da face adaxial da epiderme (FD) e do parênquima paliçádico (PP) de folhas de *C. abyssinica*, obtidas pelo cultivo *in vitro* com diferentes concentrações de citocininas após 30 dias

Concentração (μM)	FD	PP
0	21,69 a	47,74 a
5	16,16 b	29,68 b
10	17,65 ab	33,04 ab

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

As seções transversais do mesofilo de folhas de crambe coletadas no início da multiplicação *in vitro* (30 dias) sob o efeito das citocininas x concentração está apresentada na Figura 2. Apesar de bem discreto, ainda é possível perceber o limite dorsiventral, que consiste em parênquima paliçádico, com uma ou duas camadas de células justapostas pouco alongadas e de parênquima esponjoso, com três a quatro camadas de células fracamente organizadas.

Na Figura 2, é notório que o aspecto do mesofilo *in vitro* tratado com 0 μM de citocinina apresentou maior comprimento e alongamento comparado com as demais concentrações. É possível observar também que no tratamento com 10 μM de citocinina existe uma maior concentração de células (variável não avaliada) (Figura 2C). As citocininas estão associadas ao estímulo da divisão celular (HOWELL et al., 2003), explicando o menor comprimento e maior número de células observados nos tratamentos com citocininas.

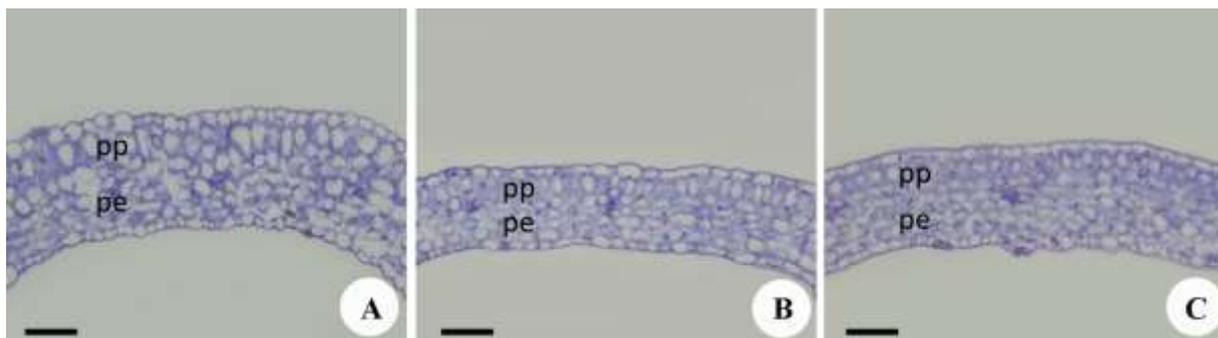


Figura 2 – Secção transversal do mesofilo (A-C) de folhas de *C. abyssinica in vitro* aos 30 dias, submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de citocininas. A: 0 μM ; B: 5 μM ; C: 10 μM . pp - parênquima paliçádico; pe - parênquima esponjoso. Barra (—) = 100 μm .

A tabela 9 mostra o resumo da análise de variância para as características anatômicas das folhas de crambe cultivadas *in vitro* com diferentes citocininas e concentrações após 120 dias. Houve interação significativa entre os fatores testados para a espessura do mesofilo e parênquima paliçádico. Analisando o fator concentração, apenas a espessura da face adaxial da epiderme demonstrou diferença estatística. Assim como observado para a análise efetuada aos 30 dias, a variação entre os tratamentos só ocorreu na face adaxial da epiderme e no parênquima paliçádico. Sugere-se que aos 30 dias, pelo pouco tempo de contato da citocinina com o explante, esse fator não teria ainda influenciado de forma a alterar efetivamente a espessura ou estrutura das características avaliadas. Entretanto, analisando-as aos 120 dias, notou-se que se mantiveram poucas alterações. Esse resultado corrobora o fato de que a multiplicação de brotos *in vitro* de crambe sob o efeito das citocininas testadas não altera a morfoanatomia das folhas até os 120 dias de cultivo.

Tabela 9. Resumo da análise de variância para a espessura (μm) do limbo, mesofilo, face adaxial e abaxial da epiderme, parênquima paliçádico e esponjoso, nervura central e área (μm^2) do feixe vascular de folhas de *C. abyssinica*, obtidas pelo cultivo *in vitro* com diferentes citocininas e concentrações após 120 dias

FV	GL	Teste F							
		Limbo	Mesofilo	Face adaxial	Face abaxial	Parênquima paliçádico	Parênquima esponjoso	Nervura central	Feixe vascular
Citocinina (A)	2	1,37 ^{ns}	1,68 ^{ns}	0,33 ^{ns}	0,42 ^{ns}	3,48*	0,77 ^{ns}	0,80 ^{ns}	1,16 ^{ns}
Concentração	2	0,48 ^{ns}	0,19 ^{ns}	3,87*	3,24 ^{ns}	1,60 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,68 ^{ns}	1,03 ^{ns}
Int. A x B	4	2,55 ^{ns}	3,33*	0,20 ^{ns}	0,18 ^{ns}	3,24*	2,13 ^{ns}	0,58 ^{ns}	1,09 ^{ns}
Resíduo	36	-	-	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	156,31	123,69	17,98	16,05	45,22	81,24	343,14	9473,68
CV (%)	-	24,71	26,87	20,13	20,40	31,26	30,57	30,90	57,00

**, * significativos a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente;

ns: não significativo;

CV(%): coeficiente de variação em porcentagem.

Para a espessura média do mesofilo aos 120 dias de cultivo (Tabela 10), apenas o TDZ demonstrou diferença entre suas concentrações testadas, sendo o maior valor (153,32 μm) observado na concentração de 5 μM , não diferindo do controle (0 μM) (127,76 μm). Dentro das concentrações testadas houve diferença em 5 μM , em que o TDZ obteve maior espessura (153,32 μm) e não diferiu da CIN (117,04 μm). Já na concentração de 10 μM , o maior valor (157,17 μm) foi observado com a CIN, não diferindo da BAP (109,23 μm). Segundo Araujo et al. (2009), quanto maior a espessura do mesofilo, maior a eficiência fotossintética. Como um dos principais problemas da aclimatização está relacionado às baixas taxas fotossintéticas, o excesso de citocininas poderia prejudicar nessa etapa. De acordo com Oliveira et al. (2008), em seu trabalho com ariticum-do-brejo (*Annona glabra* - Annonaceae), utilizando diferentes citocininas na concentração de 5 μM , a espessura do mesofilo foi afetada pela presença de BAP e CIN e não pelo TDZ e ZEA (zeatina), resultado que diverge do apresentado neste trabalho aos 120 dias, em que apenas a presença do TDZ diferenciou do controle.

Tabela 10. Espessura média (μm) do mesofilo de folhas de *C. abyssinica*, obtidas pelo cultivo *in vitro* com diferentes citocininas e concentrações após 120 dias

Citocininas	Concentração (μM)		
	0	5	10
BAP	127,76 aA	98,63 aB	109,23 aAB
CIN	127,76 aA	117,04 aAB	157,17 aA
TDZ	127,76 abA	153,32 aA	94,53 bB

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Na espessura do parênquima paliçádico aos 120 dias (Tabela 11) não foi observado diferença significativa das citocininas. Contudo, dentro das concentrações, a diferença foi na concentração de 10 μM , apresentando 63,49 μm na CIN, diferindo significativamente das demais. De forma geral, as maiores espessuras se encontravam na concentração de 0 μM , repetindo os resultados observados aos 30 dias. O uso de citocininas por tempo prolongado pode apresentar efeito fitotóxico, que é caracterizado principalmente pela falta de alongamento e redução no tamanho das folhas (GRATAPLAGLIA; MACHADO, 1998). O parênquima paliçádico é responsável pela fotossíntese, sendo fundamental o seu espessamento por permitir maior fixação de CO_2 contribuindo na autotrofia das plantas após a transferência para o ambiente *ex vitro* (SILVA et al., 2008; CASTRO et al., 2009).

Tabela 11. Espessura média (μm) do parênquima paliçádico de folhas de *C. abyssinica*, obtidas pelo cultivo *in vitro* com diferentes citocininas e concentrações após 120 dias

Citocininas	Concentração (μM)		
	0	5	10
BAP	50,45 aA	36,57 aA	31,92 aB
CIN	50,45 aA	44,51 aA	63,49 aA
TDZ	50,45 aA	49,38 aA	29,72 aB

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Em relação à espessura da face adaxial da epiderme analisada aos 120 dias (Tabela 12), a diferença apresentada foi no fator concentração, mostrando que 0 μM e 5 μM obtiveram os maiores valores (20,10 e 17,10 μm , respectivamente), não diferindo entre si e esta última não diferindo de 10 μM (16,75 μm). O aumento da espessura da epiderme foliar por parte do controle é um dos mecanismos de proteção por reduzir a penetração da radiação nos tecidos sensíveis do mesofilo foliar (SULLIVAN et al., 1996).

Tabela 12. Espessura média (μm) da face adaxial da epiderme de folhas de *C. abyssinica*, obtidas pelo cultivo *in vitro* com diferentes concentrações de citocininas após 120 dias

Concentração (μM)	Médias
0	20,10 a
5	17,10 ab
10	16,75 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

As visualizações anatômicas realizadas nos mesofilos aos 120 dias demonstrou que não existe diferença acentuada entre as citocininas a 5 μM (Figuras 3A-C). No entanto, a 10 μM a CIN é superior às demais citocininas (Figuras 3D-F), e que o parênquima paliçádico apresenta células mais alongadas, caracterizando de forma mais acentuada o limite dorsiventral do mesofilo e demonstrando maior diferenciação. Oliveira et al. (2008) também averiguaram que as folhas das plantas submetidas aos tratamentos com BAP e CIN apresentaram maior diferenciação do mesofilo comparando aos tratamentos com TDZ e ZEA, com reduzida proporção de espaços intercelulares, sugerindo uma maior eficácia dessas duas fontes de citocininas sobre o desenvolvimento do sistema assimilatório das plantas durante o cultivo *in vitro*. Os dados do último autor corroboram com os descritos para este trabalho aos 120 dias, no qual os tratamentos com BAP e CIN a 5 e 10 μM demonstraram maior diferenciação entre os parênquimas.

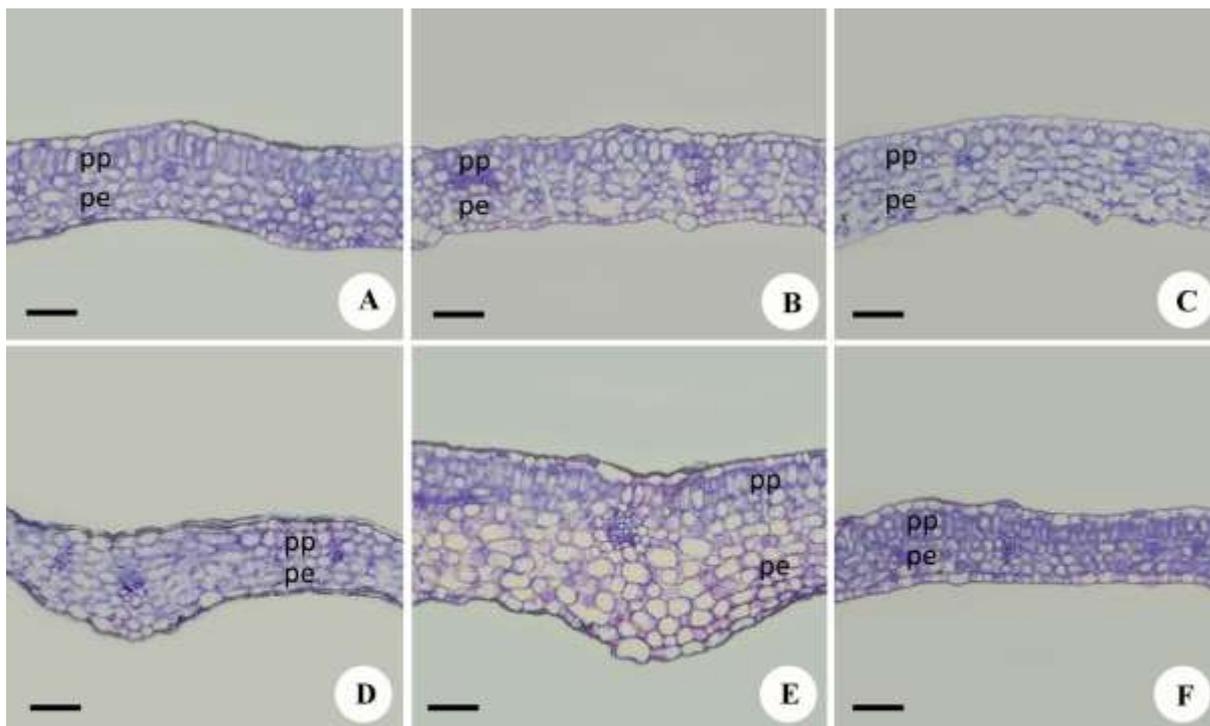


Figura 3 – Secção transversal do mesofilo de folhas de *C. abyssinica in vitro* aos 60 dias, submetidas a tratamentos com diferentes citocininas e concentrações. A: 5 μ M BAP; B: 5 μ M CIN; C: 5 μ M TDZ; D: 10 μ M BAP; E: 10 μ M CIN; F: 10 μ M TDZ. pp - parênquima paliádico; pe - parênquima esponjoso. Barra (—) = 100 μ m.

4- CONCLUSÕES

As diversas fontes de citocininas e concentrações utilizadas no experimento 02 deste trabalho não promoveram mudanças, no sentido de alterar a organização e/ou a espessura das folhas em relação ao controle. Por conseguinte, os tratamentos empregados no experimento 02 não alteraram morfológicamente as folhas. Certamente, as alterações observadas na estrutura e espessura das folhas dos tratamentos da aclimatização 01 e 02 do experimento 01 prejudicaram o processo de estabelecimento da muda *ex vitro*.

5- REFERÊNCIAS

ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S.F.L.; VIANA, V.R.C.; NEVES, L.J. Anatomia foliar de *Rollinia mucosa* Jacq. Baill. (Annonaceae) sob condições de cultivo *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, p. 35-46, 2001.

ALVES, E.S.; ANGYALOSSY-ALFONSO, V. Ecological trends in the wood of some Brazilian species: growth rings and vessels. **IAWA Journal**, v. 21, p. 3-30, 2000.

APÓSTOLO, N.M.; BRUTTI, C.B.; LLORENTE, B.E. Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 41, p. 307–313, 2005.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; VIEIRA, M.L.C.; DORNELAS, M.C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 11, p. 2007-2013, 1999.

ARAÚJO, A.G.de; PASQUAL, M.; MIYATA, L.Y.; CASTRO, E.M.de; ROCHA, H.S. Qualidade de luz na biometria e anatomia foliar de plântulas de *Cattleya loddigesii* L. (Orchidaceae) micropropagadas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 9, 2009.

BARBOZA, S.B.S.C.; GRACIANO-RIBEIRO, D.; TEIXEIRA, J.B.; PORTES, T.A.; SOUZA, L.A.C. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 185-194, 2006.

BATAGIN-PIOTTO, K.D; ALMEIDA, C.V.de; PIOTTO, F.A; ALMEIDA, M.de. Anatomical analysis of peach palm (*Bactris gasipaes*) leaves cultivated *in vitro*, *ex vitro* and *in vivo*. **Brazilian Journal of Botany**, v. 35, n. 1, p. 71-78, 2012.

BOEGER, M.R.T.; POULSON, M.E. Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a morfologia foliar de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 2, p. 329-338, 2006.

BONDIOLI, P.; FOLEGATTI, L.; LAZZERI, L.; PALMIERI, S. Native *Crambe abyssinica* oil and derivatives as renewable lubricants: an approach to improve its quality by chemical and biotechnological processes. **Industrial Crops and Products**, v. 7, p. 231–238, 1998.

BRAGA, F.T.; PASQUAL, M.; CASTRO, E.M.de; RAFAEL, G.C.; FAVERO, A.C.; VALENTE, T.C.T. Alterações morfofisiológicas de plantas de abacaxizeiro influenciadas por diferentes substratos durante o processo de aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 5, 2011.

CALVETE, E.O.; AZEVEDO, M.; BORDIGNON, M.H.; SUZIN, M. Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 649-653, 2002.

CAPELLE, A.; TITTONEL, E.D. Crambe, a potential non-food oil crop: production. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v. 10, p. 22–27, 1999.

CASTRO, E.M.; PEREIRA, F.J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal**: estrutura e função de órgãos vegetativos. 1 ed. Lavras-MG: Editora UFLA, 2009, v. 1, 234 p.

CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 1199–1205, 2010.

CHHIKARA, S.; DUTTA, I.; PAULOSE, B.; JAIWAL, P. K.; DHANKHER, O. P. Development of an *Agrobacterium*-mediated stable transformation method for industrial oilseed crop *Crambe abyssinica* 'BelAnn'. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 457-465, 2012.

CHIRINÉA, C.F; PASQUAL, M.; ARAUJO, A.G.de; PEREIRA, A.R.; CASTRO, E.M.de. Acclimatization and leaf anatomy of micropropagated fig plantlets. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 34, n. 4, p. 1180-1188, 2012.

COOKE, L.; KONSTANT, D.A. What's new in oilseeds? Check out *Crambe*. **Agricultural Research Service**, v. 39, p. 16-17, 1991.

DOUSSEAU, S.; ALVARENGA, A.A.de; CASTRO, E.M.de; SOARESI, R.P.; EMRICHV, E.B; MELO, L.A.de. Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl.) NIch. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante a aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1694- 1700, 2008.

EAPEN, S.; TIVAREKAR, S.; GEORGE, L. Thidiazuron induced shoot regeneration in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 53, p. 217-220, 1998.

FERMINO JUNIOR, P.C.P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Características anatômicas de folhas de Teca (*Tectona grandis* L.) desenvolvidas sob condições de cultivo *in vitro* e *ex vitro*. **Evidência**, v. 9, n. 1-2, p. 17-28, 2009.

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

FURTADO, C.M.; CARVALHO, J.M.F.C.; CASTRO, J.P.de; SILVA, H. Comparação da frequência de regeneração *in vitro* do amendoim (*Arachis hipogaea*), utilizando diferentes citocininas. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, n. 1, p. 51-58, 2007.

GAO, H.B.; WANG, Y.; GAO, F.; LUO, P. Studies on the Plant regeneration from single cell culture of *Crambe abyssinica*. **Hereditas**, v. 20, p. 50-52, 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p. 183-260.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JR.F.T.D.; GENEVE, R.L. 2002. **Plant propagation: principles and practices**. Prentice-Hall/Englewood Cliffs, New Jersey. 7th ed. Upper saddle River: Prentice Hall.

HAZARIKA, B.N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v. 108, p. 105-120, 2006.

HOWELL, S.H.; LALL, S.; CHE, P. Cytokinins and shoot development. **Trends in Plant Science**, v. 8, n. 9, p. 453-459, 2003.

HRONKOVA, M.; ZAHRADNICKOVA, H.; SIMKOVA, M.; SIMEK, P.; HEYDOVÁ, A. The role of abscisic acid in acclimation of plants cultivated *in vitro* to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, v. 46, p. 535–541, 2003.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. 2. ed. New York: Mc-Graw-Hill, 1940. 523 p.

KADLECEK, P.; TICHÁ, I.; HAISEL, D.; CAPKOVÁ, V.; SCHAFER, C. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. **Plant Science**, v. 161, p. 695–701, 2001.

KOZAI, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (eds.). **Micropropagation: Technology and Application**, Kluwer, Dordrecht, 1991, p. 447–469.

KRIKORIAN, A.D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W.R.; MROGINSKI, L.A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. p.41-78.

LEE, D.W.; OBERBAUER, S.F.; JOHNSON, P.; KRISHNAPILAY, B.; MANSOR, M.; MOHAMAD, H.; YAP, S.K. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two Southeast Asian Hopea (dipterocarpaceae) species. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 4, p. 447-455, 2000.

LI, X.; AHLMAN, A.; LINDGREN, H.; ZHU, L. H. Highly efficient *in vitro* regeneration of the industrial oilseed crop *Crambe abyssinica*. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 170-175, 2011.

LI, X.; AHLMAN, A.; YAN, X.; LINDGREN, H.; ZHU, L.-H. Genetic transformation of the oilseed crop *Crambe abyssinica*. **Plant Cell Tiss Organ Culture**, v. 100, p. 149–156, 2010.

LOURO, R.P.; SANTIAGO, L.J.M.; SANTOS, A.V.; MACHADO, R.D. Ultrastructure of *Eucalyptus grandis* x *E.urophylla* plants cultivated *ex vitro* in greenhouse and field conditions. **Trees**, v. 17, p. 11-22, 2003.

MAJADA, J.P.; CENTENO, M.L.; FEITO, I.; FERNANDEZ, B.; SANCHEZ-TAMEZ, R. Stomatal and cuticular traits on carnation tissue culture under different ventilation conditions. **Plant Growth Regulation**, v. 25, p. 113–121, 1998.

MARINO G.; BERTAZZA G. Micropropagation of *Actinidia deliciosa* Cvs Hayward and Tomuri. **Scientia Horticulturae**, v. 45, p. 65-74, 1990.

MASSOURA, E.; VEREIJKEN, J.M.; KOLSTER, P.; DERKSEN, J.T.P. Proteins from *Crambe abyssinica* oilseed. Biochemical and functional properties. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, p. 329–335, 1998.

MATHUR, A.; MATHUR, A.K.; VERMA, P.; YADAV, S.; GUPTA, M.L.; DAROKAR, M.P. Biological hardening and genetic fidelity testing of micro-cloned progeny of *Chlorophytum borivilianum*. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 1046–1053, 2008.

- MAYER, J.L.S.; RIBAS, L.L.F.; BONA, C.; QUOIRIN, M. Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium* Hort. (Orchidaceae) cultivadas *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 2, p. 323-332, 2008.
- MULDER, J.H.; MASTEBROEK, H.D. Variation for agronomic characteristics in *Crambe hispanica*, a wild relative of *Crambe abyssinica*. **Euphytica**, v. 89, p. 267-278, 1996.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tabaco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- MURPHY, D. J. Production of novel oils in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 175-180, 1999.
- NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; MARTINS, C.F; RUSSOWSKI, D. Micropropagação do ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 2, p. 11-8, 2001.
- O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.
- OLIVEIRA, L.M.de; PAIVA, R.; ALOUFA, M.A.I.; CASTRO, E.M.de; SANTANA, J.R.F.de; NOGUEIRA, R.C. Efeitos de citocininas sobre a anatomia foliar e o crescimento de *Annona glabra* L. durante o cultivo *in vitro* e *ex vitro*. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, 2008.
- PALMER, C.D.; KELLER, W.A. Somatic embryogenesis in *Crambe abyssinica* Hochst. Ex R.E. Fries using seedling explants. **Plant Cell Tiss Organ Culture**, v. 104, p. 91-100, 2011.
- PATNAIK, S.K.; SAHOO, Y.; CHAND, P.K. Migropropagation of a fruit tree, *Morus australis* Poir. Syn. *M. acidosa* Griff. **Plant Cell Report**, v. 15, p. 841-5, 1996.
- PENNELL, D. Strawberry micropropagation within the UK. In: BOXUS, P.; LARVOR, P. (Eds.). **In vitro culture of strawberry plants**. Bruseels: Commission of the European Communities, p. 27-34, 1987.
- PEREIRA, F.D.; PINTO, J.E.B.P; CARDOSO, M.G.; LAMEIRA, O.A. Propagação *in vitro* de chapéu-de-couro (*Echinodorus* cf. *scaber* Rataj), uma planta medicinal. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24 (Edição especial), p. 74-80, 2000.
- PEREIRA, J.E.S.; FORTES, G.R.L. Multiplicação e aclimatização da macieira influenciada pelo tipo de explante e pelo tempo de permanência em meio de cultura de enraizamento. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 23, p. 417-420, 2001.
- PORTO, J.M.P; PAIVA, P.D.deO.; PAIVA, R.; VARGAS, D.P.; CASTRO, E.M.de; BRAGA, F.T. **Variação na anatomia foliar de plântulas de ipê-branco *in vitro* e aclimatizadas em diferentes substratos**. Disponível em: www.sbpcnet.org.br/livro/lavras/resumos/707.pdf. Acesso em: 05 de Jan. 2014.
- PREECE, J.E.; SUTTER, E.G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (eds.). **Micropropagation: Technology and Application**, Kluwer, Dordrecht, 1991, pp. 71-93.

- ROMANO, A.; MARTINS-LOUCAO, M.A. Water loss and morphological modifications in leaves during acclimatization of cork oak micropropagated plantlets. **Acta Horticulturae**, n. 616, p. 439-442, 2003.
- SATO, A.Y.; TEIXEIRA, H.C.D.; ANDRADE, L.A.de; SOUZA, V.C.de. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, v. 7, n. 2, p. 117-123, 2001.
- SEELYE, J.F.; BURGE, G.K.; MORGAN, E.R. Acclimatizing Tissue Culture Plants: Reducing the Shock. **Combined Proceedings International Plant Propagators' Society**, v. 53, p. 85-90, 2003.
- SIGMAPLOT: EXACT GRAPHS AND DATA ANALYSIS. Version 10.0. **Systat Software**, Alemanha, URL: <http://www.sigmaplot.com/index.php>, 2006.
- SILVA, A.B.da; PASQUAL, M.; CASTRO, E.M.de; MIYATA, L.Y.; MELO, L.A.de; BRAGA, F.T. Luz natural na micropropagação do abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr). **Interciência**, v. 33, n. 11, p. 839-843, 2008.
- SILVA, F.deA.S.E.; AZEVEDO, C.A.V.de. Principal Components Analysis in the Software Assisat-Statistical Attendance. In: **WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE**, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.
- SULLIVAN, J.H.; HOWELLS, B.W.; RUHLAND, C.T.; DAY, T.A. Changes in leaf expansion and epidermal screening effectiveness in *Liquidambar styraciflua* and *Pinus taeda* in response to UV-B radiation. **Physiologia Plantarum**, v. 98, p. 349-357, 1996.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2006. Fisiologia vegetal. 722 p. 3ed. Porto Alegre, Artmed.
- UENO, O. Structural and biochemical characterization of the C3–C4 intermediate *Brassica gravinae* and relatives, with particular reference to cellular distribution of Rubisco. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 15, p. 5347–5355, 2011.
- VARGAS-LOPEZ, J.M.; WIESENBORN, D.; TOSTENSON, K.; CIHACEK, L. Processing of Crambe oil and isolation of erucic acid. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, p. 801–809, 1999.
- WANG, Y.; PENG, P. Intergeneric hybridization between Brassica species and *Crambe abyssinica*. **Euphytica**, v. 101, p. 1-7, 1998.
- WANG, Y.P.; SNOWDON, R.J.; RUDLOFF, E.; WEHLING, P.; FRIEDT, W.; SONNTAG, K. Cytogenetic characterization and fae1 gene variation in progenies from asymmetric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Crambe abyssinica*. **Genome**, v. 47, p. 724-731, 2004.
- WANG, Y.P.; SONNTAG, K.; RUDLOFF, E. Development of rapeseed with high erucic acid content by asymmetric somatic hybridization between *Brassica napus* and *Crambe abyssinica*. **Theor. Appl. Genet.**, v. 106, p. 1147-1155, 2003.

ZOBAYED, S.M.A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Leaf anatomy of *in vitro* tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. **Plant Science**, v. 161, p. 537–538, 2001.

5- CONCLUSÕES GERAIS

Para a germinação *in vitro* de plantas de crambe, o meio B5 e o WPM se mostraram mais favoráveis, sendo que, a presença ou ausência de pericarpo nas sementes não influenciou nas condições aqui testadas. A presença de luz é recomendada, pois sua ausência estimula o estiolamento das plantas e o não desenvolvimento do epicótilo.

Na micropropagação, os resultados mostraram uma frequência satisfatória de regeneração de brotos a partir de segmentos apicais de crambe em meios contendo 5 μM de BAP. O alongamento foi satisfatório com 1 μM de GA₃. Contudo, existe a necessidade de um enraizamento e aclimatização eficiente para completa propagação *in vitro* de crambe.

Com relação à estabilidade genética, os resultados utilizando marcadores ISSR indicaram que o segmento apical é um explante confiável para a multiplicação de plantas de crambe geneticamente verdadeiras (true-to-type).

As diversas fontes de citocininas e concentrações utilizadas neste trabalho não promoveram mudanças, no sentido de alterar a organização interna e/ou a espessura das folhas em relação ao controle. Portanto, esses reguladores de crescimento não alteraram morfológicamente as folhas. As alterações observadas na estrutura e espessura das folhas dos tratamentos da aclimatização prejudicaram o processo de estabelecimento da muda *ex vitro*.

O protocolo de regeneração de plantas de crambe *in vitro* pode ser útil no processo de criação e desenvolvimento de novas cultivares em um tempo mais curto e no melhoramento genético usando explantes apicais.