



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Departamento de Botânica
Laboratório de Biologia Celular de Plantas (BIOCEL)
Departamento de Ecologia
Laboratório de Dinâmica de Ecossistemas

PROJETO DE PESQUISA

TÍTULO: ESTABELECIMENTO DE UM BANCO DE GERMOPLASMA *EX SITU* DE PLANTAS DO BIOMA CERRADO

Pesquisador Responsável: Eny Iochevet Segal Floh

EQUIPE EXECUTORA

Eny I. S. Floh (coordenadora)-Docente-IBUSP-Depto. Botânica-BIOCEL (enyfloh@usp.br)

Maria Magdalena Rossi-Docente-IBUSP-Depto. Botânica-GMP (magdarossirosso@gmail.com)

Sérgio Tadeu Meirelles-Docente- IBUSP – Depto. Ecologia (stmeirel@ib.usp.br)

André L. Wendt Santos-Pós-doc (FAPESP)-IBUSP-Depto. Botânica-BIOCEL

(alwsantos@yahoo.com.br)

Paula Maria Elbl-Pós-doc (Capes/PNPD)-IBUSP-Depto. Botânica-BIOCEL

(paulaelbl@gmail.com)

Erico Fernando L. Pereira-Silva-Pós-doc (Capes)-IBUSP-Depto. de Ecologia

(candeya@gmail.com)

Amanda Ferreira Macedo- Técnica PROCONTES-IBUSP-Depto. Botânica-BIOCEL

(afmacedo@usp.br)

Silvia Regina Blanco-Técnica-IBUSP-Depto. Botânica-BIOCEL (srblanco@ib.usp.br)

Resumo: As espécies nativas do bioma do cerrado são difíceis de serem propagadas através de sementes por apresentarem algumas características como: heterogeneidade no processo de maturação dos frutos e sementes com algum tipo de dormência, o que compromete a germinação. Adicionalmente, muitas destas sementes são recalcitrantes, comprometendo sua longevidade e viabilidade, constituindo um limitador para a sua conservação na forma de semente. Desta maneira, a alternativa mais viável de conservação a médio e longo prazo das plantas do bioma cerrado, constitui o estabelecimento de bancos para conservação de germoplasma *in vitro*. Assim, o presente projeto tem como objetivo o estabelecimento de um banco de germoplasma *in vitro* para plantas do bioma do cerrado. Será utilizada a técnica de cultura de tecidos, para a micropropagação e manutenção de diferentes espécies *in vitro*. Ressalta-se que, para plantas nativas do cerrado, embora este seja um procedimento relevante na propagação e constituição de banco de germoplasma, a sua aplicação e conhecimento é incipiente, e restrito a um pequeno número de materiais.

I. PROJETO DE PESQUISA

TÍTULO: ESTABELECIMENTO DE UM BANCO DE GERMOPLASMA *EX SITU* DE PLANTAS DO BIOMA CERRADO

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSERVAÇÃO E COLEÇÕES DE GERMOPLASMA

As altas taxas de erosão de recursos genéticos e a perda de componentes da biodiversidade em virtude da maciça destruição de habitats, tanto pela seleção natural como também pelos seres vivos e não vivos, tem aumentado o interesse pela conservação de germoplasma.

A conservação de recursos genéticos, por meio da manutenção de coleções de germoplasma, é uma realidade em vários países, através do estabelecimento de bancos de germoplasma. A conservação de germoplasma de raças locais, cultivares domesticadas, e parentes silvestres de espécies agrônômicas e florestais, têm sido uma das mais importantes áreas de pesquisa na Botânica. Os estudos nesta área concentram-se no desenvolvimento de técnicas para a conservação em longo prazo da variabilidade genética de espécies vegetais, com a máxima integridade genética e biológica possível (Bajaj, 1995; Panis & Lombardi, 2005; Häggman *et al.* 2007).

Dentre as estratégias utilizadas para a conservação destacam-se aquelas denominadas *in situ* e *ex situ*. A conservação *in situ* refere-se à manutenção das espécies selecionadas no seu habitat natural em parques, reservas biológicas ou reservas ecológicas. Deve-se considerar, entretanto, que este método é oneroso, visto depender de eficiente e constante manejo e monitoramento, pode exigir grandes áreas, o que nem sempre é possível. A conservação *ex situ* é aquela onde as espécies vegetais são mantidas fora do seu ambiente natural, através de coleções de plantas no campo, de sementes em bancos de sementes, ou de coleções de plântulas em bancos *in vitro*. Para o caso da conservação *ex situ*, são as seguintes as principais modalidades: coleção de base, coleção ativa, coleção de trabalho, coleção a campo, coleção *in vitro*, coleção em criopreservação, coleção nuclear e banco genômico.

A conservação de sementes é a forma mais comum de conservação *ex situ*, já que a semente é a unidade de propagação natural para a maioria das espécies de plantas superiores. Muitas espécies produzem sementes ortodoxas, isto é, sementes que podem ser desidratadas para aproximadamente 5% do teor de umidade inicial e armazenadas a aproximadamente -18 °C

(Roberts, 1973). Nestas condições, a longevidade das sementes pode ser prolongada por muitas décadas, sendo, portanto, a estratégia adotada pela maioria dos bancos de sementes (Walters *et al.*, 2005; Ellis & Jenderek, 2008). Entretanto, existem sementes muito sensíveis (recalcitrantes) ou moderadamente sensíveis (intermediárias) à desidratação e ao congelamento, que não sobrevivem ao armazenamento em tais condições (Ellis *et al.*, 1990 e 1991; Roberts, 1973; Santos, 2000). Estas sementes permanecem sensíveis à desidratação durante o desenvolvimento e após a dispersão (Berjak & Pammenter, 2004), e são caracterizadas por apresentar um curto período de vida pós-colheita de dias ou meses ou, no caso de espécies de clima temperado, um ou dois anos, dependendo do quanto tais sementes possam tolerar baixas (mas não sub-zero) temperaturas (Chin & Roberts, 1980).

Além de problemas relacionados à recalcitrância, várias outras espécies de plantas necessitam de procedimentos de conservação alternativos. Este é o caso de espécies que se propagam exclusivamente por propagação vegetativa, pois: a) não produzem sementes viáveis; b) apresentam intensa heterozigosidade ou expressão de caracteres indesejáveis na população; c) são espécies arbóreas de grande porte que demoram muitos anos para passar do estágio juvenil para o estágio adulto reprodutivo. Nestes casos, o mais utilizado é a conservação de outro propágulo, que não a semente. Estas espécies problema, têm sido mantidas em bancos no campo, casas de vegetação ou em bancos de germoplasma *in vitro*.

Para as plantações no campo ou casas de vegetação a conservação é eficiente para a manutenção de coleções por curto e médio prazo apenas. Entretanto, esta metodologia requer grandes extensões de terra e envolve altos custos de manutenção associados com poda, controle de pestes, pragas e ervas daninhas, propagação e fertilização, entre outros. Igualmente preocupante é o fato de que plantas conservadas no campo estão vulneráveis ao ataque de pragas e doenças e a desastres climáticos, os quais podem subitamente dizimar toda a coleção (Engelmann, 1991; Stushnoff, 1987).

A possibilidade de obter plantas inteiras a partir de células isoladas, de tecidos e de órgãos de plantas, pelo uso de técnicas de cultura de tecidos, levou ao estabelecimento dos bancos de germoplasma *in vitro* (Harding *et al.*, 1997; George, 1993). A conservação *in vitro* envolve manutenção de culturas em crescimento ativo através de subculturas periódicas de brotos e segmentos nodais conservados com sucesso pelo uso dessa metodologia (Bajaj, 1995). Nessa técnica pequenos fragmentos de tecido vivo, chamados explantes, são isolados de um organismo vegetal, desinfestados e cultivados assepticamente por períodos indefinidos em um meio de cultura apropriado. O objetivo é obter nova planta idêntica à original, ou seja, realizar

uma clonagem vegetal de modo a obter um novo indivíduo, mantendo-se o genótipo idêntico ao do ancestral comum. Dentre as aplicações da cultura de tecidos vegetais, a micropropagação é a técnica de maior impacto e de resultados mais concretos (Grattapaglia & Machado, 1998). Engloba diferentes etapas que vão desde o estabelecimento da cultura *in vitro* até seu enraizamento, culminando com a aclimatização da microplanta (Bastos *et al.*, 2007) para ser levada à campo. Ressalta-se que cada espécie requer técnicas especialmente formuladas e o estabelecimento e manutenção *in vitro* do germoplasma, pode ser realizada através de ápices caulinares, embriões zigóticos e/ou somáticos, plântulas, ou até mesmo calos (Ferreira *et al.*, 1998).

Para a conservação de germoplasma *in vitro* é necessária a mudança no ambiente de cultivo para desacelerar ou suprimir totalmente o crescimento de células, tecidos e órgãos. O objetivo de desacelerar o crescimento é aumentar ao máximo o intervalo entre os subcultivos, ou estendê-los indefinidamente, reduzindo-se assim a mão-de-obra e o espaço necessário para a sua conservação. Esta situação pode ser conseguida através da redução da temperatura e/ou intensidade luminosa, diluição dos elementos nutritivos no meio de cultura e pela aplicação de agentes químicos, osmóticos e hormonais no meio, capazes de inibir o crescimento do material em cultivo (Withers & Williams, 1998; Borém, 2001).

A possibilidade da utilização dos métodos de conservação *in vitro* é atrativa tanto por motivos econômicos quanto práticos, sendo um componente adicional importante do tratamento de recursos genéticos e, principalmente, de espécies ameaçadas de extinção e conservação de espécies com sementes recalcitrantes ou intermediárias ou aquelas propagadas vegetativamente (Engelmann, 1991; Kartha, 1985; Withers & Williams, 1998).

As espécies nativas do bioma do cerrado são difíceis de serem propagadas através de sementes por apresentarem algumas características como: heterogeneidade no processo de maturação dos frutos e sementes com algum tipo de dormência, o que compromete a germinação. Adicionalmente, muitas destas sementes são recalcitrantes, comprometendo sua longevidade e viabilidade, constituindo um limitador para a sua conservação na forma de semente. Desta maneira, a alternativa mais viável de conservação a médio e longo prazo das plantas do bioma cerrado, constitui o estabelecimento de bancos para conservação de germoplasma *in vitro*. Destaca-se que iniciativas com esta abordagem, para plantas do cerrado, são escassas no Brasil destacando-se: Embrapa Recursos Genéticos, a Embrapa Mandioca e Fruticultura, a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP) e a Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP).

A aplicação de técnicas de cultura de tecidos para a propagação de plantas do cerrado pode resolver ou minimizar estes entraves através da multiplicação sistematizada de plantas; intercâmbio de material genético; resgate de germoplasma e preservação de material ameaçado; redução no período de germinação; isenção de pragas e doenças e; uniformização nas plântulas obtidas.

O cultivo *in vitro* é um procedimento relevante na propagação de diferentes espécies, porém, o nível de conhecimento sobre essa técnica em nativas do cerrado é incipiente, e restrita a um pequeno número de plantas (Moraes *et al.*, 2007).

1.2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A possibilidade conservação através da instalação de bancos de germoplasma, tem constituído uma alternativa de conservação e recuperação das espécies vegetais. Assim, o presente projeto tem como objetivo o estabelecimento de um banco de germoplasma *in vitro* para plantas do bioma do cerrado. A adequação deste projeto aos objetivos da Superintendência de Gestão Ambiental refere-se ao fato de se dar ênfase à propagação de espécies do cerrado, difíceis de serem encontradas em viveiros e para comercialização, e possibilitando o fornecimento de indivíduos para a restauração de áreas de cerrado, dentre ela, algumas Reservas Ecológicas recentemente decretadas pela própria Universidade (áreas de cerrado em Pirassununga e no proprio campus da Capital-Butantan).

Os aspectos de conservação e propagação, em especial de espécies nativas, como *Araucaria angustifolia*, *Ocotea catharinensis* e *O. odorifera*, tem sido contemplados no Laboratório de Biologia Celular de Plantas (BIOCEL), do Departamento de Botânica do IBUSP. Estas abordagens, têm sido realizadas com o emprego de técnicas biotecnológicas, como a embriogênese somática e a conservação de germoplasma através diferentes metodologias, incluindo a criopreservação. O referido laboratório possui uma tradição de mais de 30 anos, com trabalhos relacionados em estudos na área de Biotecnologia Vegetal e Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal, relacionadas com o controle e monitoramento dos processos de morfogênese *in vivo* e *in vitro*. Além de possuir todas as condições de infraestrutura para o cultivo *in vitro* e manutenção de um banco de germoplasmas *ex situ*, o BIOCEL possui um biotério cadastrado pela USP e pertence ao NAP-PN/Núcleo de Apoio à Pesquisa em Diversidade Molecular. Suas atividades tem contemplado um público bastante amplo e diversificado, incluindo pesquisadores, empresas, alunos do ensino fundamental, médio e superior, de pós-graduação, privado e público, e outros interessados.

A presente proposta será desenvolvida em associação com o Departamento de Ecologia, do IBUSP, com a participação da equipe do docente Prof. Dr. Sérgio Tadeu Meirelles, grupo com longa tradição e reconhecimento na temática de savanas tropicais (cerrado).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS VEGETAIS

Como materiais vegetais serão utilizados diferentes exemplares de plantas provenientes do bioma cerrado como: *Anacardium humile*, *Annona coriaceae*, *Xylopia aromatica*, *Aspidosperma tomentosum*, *Kielmeyera coriaceae*, *Erythroxylum suberosum* e *E. tortuosum*, *Campomanesia adamantium*, *Myrcia língua*, *Byrsonima coccolobifolia*, *B. coriaceae*, *Styrax camporum*, *S. ferrugineum*, *Cochlospermum regium*, *Pfaffia juabata*, *Lippia lupulina*, *Gomphrena macrocephala*, *Qualea parviflora*, *Solanum lycocarpum*, *Tristachya leiostachya*, *Axonopus barbigerus*, *Neea teifera*.

2.2. CULTIVO IN VITRO

2.2.1. ESTABELECIMENTO DAS CULTURAS

Os materiais a serem cultivados serão processados de acordo com a especificidade de cada espécie. Assim poderão ser utilizados como fonte de explantes iniciais tecidos ou órgãos de materiais germinados *in vitro* ou explantes provenientes de plantas oriundas do campo.

2.2.2. ASSEPSIA E CULTIVO IN VITRO DO MATERIAL VEGETAL

Para assepsia do material coletado a campo (sementes, folhas, gemas e brotos) e posterior introdução *in vitro* serão testados os seguintes protocolos de desinfestação: **a)** imersão do material vegetal por 1 min. em solução de 70% (v/v) de etanol, seguida da imersão por 25 min. em solução de hipoclorito de sódio (2 % (p/v) cloro ativo) nas concentrações de 0, 2.5, 5, 10, 15 e 25% (v/v); **b)** imersão dos discos foliares por 1 min. em solução de 70% (v/v) de etanol, seguida da imersão por 25 min. em solução de AgNO₃ nas concentrações de 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 e 1% (p/v). Após a assepsia, os explantes serão lavados três vezes em água destilada autoclavada. Em seguida, os explantes serão inoculados em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio MS ou ½ MS (Murashige & Skoog, 1962) 2% (p/v) de sacarose, 0.15% (p/v) de carvão ativado, 0.3% (p/v) de Gelrite® (Sigma) e diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento (**vide item 2.3**). O pH do meio de cultura será ajustado para 5,8 e os tubos contendo

os explantes armazenados em diferentes condições de fotoperíodo (16h luz/ 8h escuro ou 24h de escuro), intensidade luminosa de $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a temperatura de $26 \pm 2^\circ \text{C}$. Durante os primeiros 14 dias de cultivo serão feitas observações a cada três dias para determinação da taxa de contaminação (fungos e bactérias) dos explantes mantidos *in vitro*.

2.2.3. MICROPROPAGAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

2.2.3.1. ORGANOGÊNESE DIRETA E INDIRETA

Para os experimentos de organogênese direta serão utilizados gemas e brotos provenientes de mudas das espécies alvo do projeto. Para realização destes experimentos serão utilizadas as condições de meio de cultura especificadas no **item 2.2.** acrescidas de citocininas e auxinas.

- a) Experimento 1 – Para a indução e crescimento de gemas axilares (brotação) serão utilizadas as formulações salinas MS e $\frac{1}{2}$ MS suplementadas com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) (0 a $30 \mu\text{M}$). Após 30 dias de cultivo no escuro a $26 \pm 2^\circ \text{C}$ serão avaliados a porcentagem de gemas axilares induzidas e comprimento médio das brotações.
- b) Experimento 2 – Para a fase de multiplicação das brotações serão testadas as citocininas: BAP, cinetina (Cin) e tiadiazurom (TDZ) (0 a $20 \mu\text{M}$), em combinação com a auxina ácido naftaleno acético (ANA) (0 a $10 \mu\text{M}$). Para esta fase serão utilizadas como explante inicial brotações com 1 cm de comprimento (provenientes do experimento 1). A taxa de multiplicação e o crescimento das brotações serão avaliadas após três subcultivos no mesmo meio de cultura (um subcultivo a cada 45 dias).
- c) Experimento 3 – Para avaliar a capacidade de enraizamento serão utilizadas brotações com 2 cm de altura (provenientes do experimento 2), cultivadas na presença de ANA (0 a $50 \mu\text{M}$). Após 30 dias de cultivo será feita a contagem do número de brotações enraizadas.

Para os experimentos de organogênese indireta (indução de calogênese) serão utilizados diferentes tipos de explantes (p.ex.: discos foliares, pecíolos, etc.). Para realização destes experimentos serão utilizadas as condições de meio de cultura especificadas no **item 2.2** acrescidas de citocininas e auxinas.

- d) Experimento 4 – Os explantes serão cultivados em meio de cultura suplementados com diferentes concentrações de auxinas (AIA, ANA, 2,4-D) e BAP (0 a $20 \mu\text{M}$). Após 45

dias de cultivo será determinada a porcentagem de explantes foliares apresentando a indução de calos.

- e) Experimento 5 – Para determinação do potencial morfogênético dos calos será feito o isolamento das proliferações celulares obtidas no experimento 4. Calos isolados serão subcultivados em meio semi-sólido e líquido (três subcultivos de 30 dias), e em seguida cultivados em diferentes concentrações de BAP (0 a 20 μ M). Após 45 dias de cultivo será feita a contagem dos calos apresentando a formação de brotações.
- f) Experimento 6 – Caso ocorra a formação de parte aérea nas estruturas provenientes do experimento 5 serão realizados ensaios de enraizamento conforme descrito no experimento 3.

2.2.3.2. ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DO MATERIAL REGENERADO *IN VITRO*

Os brotos regenerados via organogênese direta e/ou indireta, ou brotação, serão isolados e inoculados em meio MS contendo 2% (p/v) de sacarose, na ausência de reguladores de crescimento, ou em diferentes tipos e concentrações de auxinas. O pH do meio de cultura será ajustado para 5,8 e as culturas mantidas na luz (16h luz/ 8h escuro) a temperatura de 26 ± 2 °C. Os materiais enraizados serão transferidos para casa de vegetação, após aclimação (cf. **item 2.4**), ou mantidos *in vitro*. Neste último caso, o material será repicado, micropropagado, e mantido em crescimento lento, para constituir o banco de germoplasma das espécies selecionadas.

2.2.3.3. EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Para os experimentos de embriogênese serão utilizados diferentes explantes das espécies alvo do projeto. Para realização destes experimentos serão utilizadas as condições de meio de cultura especificadas no **item 2.2** acrescidas de citocininas e auxinas, mais especificamente o 2,4-D.

- a) Experimento 1 – Para indução das culturas embriogênicas, explantes serão isolados e cultivados em meio de cultura suplementado com diferentes combinações de 2,4-D e BAP (0 a 20 μ M). Após 45 dias de cultivo será feita a contagem dos explantes apresentando a formação de proliferações celulares. Para determinação do potencial embriogênético das culturas induzidas serão feitos testes histoquímicos utilizando acetocarmin e azul de Evans (Gupta & Durzan, 1987).

- b) Experimento 2 – Para proliferação das culturas celulares serão utilizadas as mesmas condições testadas durante a fase de indução. O subcultivo das culturas celulares será realizado em meio semi-sólido e líquido em intervalos de 30 dias.
- c) Experimento 3 – Para formação dos embriões somáticos maduros, as proliferações celulares provenientes do experimento 2 serão transferidas para meio de cultura contendo diferentes concentrações de 2-isopentil adenina (2-IP) (0 a 10 μ M) e BAP (0 a 20 μ M). Após 45 dias de cultivo será feita utilizando um estereomicroscópio a contagem do número de embriões somáticos maduros.
- d) Experimento 4 – Embriões maturados serão transferidos para meio de cultura ausente de reguladores de crescimento, e expostos à luz durante 20 dias. Embriões geminados serão aclimatados conforme descrito no **item 2.4**.
- e) Experimento 5 – Os embriões somáticos que não forem destinados aos experimentos de germinação, serão destinados a processos de conservação utilizando meio de cultura com baixas concentrações de sacarose (1 a 2% (p/v) ou então em regimes de baixa temperatura (4 a 10 \pm 2 °C).

2.3. ACLIMATAÇÃO EX VITRO

Parte das plântulas regeneradas, enraizadas e cultivadas *in vitro*, serão transferidas para casa de vegetação onde será feita a aclimação. Esta etapa consiste da transferência do material para vasos individuais contendo solo de cerrado, onde serão inicialmente, mantidos em câmaras úmidas. Após um período de aproximadamente 4 semanas, os materiais serão retirados das condições de alta umidade, e aclimatizados nas condições naturais da casa de vegetação.

2.4. MANUTENÇÃO DOS BANCOS DE GERMOPLASMA

As plântulas regeneradas *in vitro*, via organogênese e/ou embriogênese, serão mantidas em cultura e constituirão o banco de germoplasma das espécies selecionadas. Para tanto, os materiais serão subcultivados em intervalos regulares e mantidos em crescimento lento ou mínimo, a serem estabelecidos (redução de temperatura e/ou intensidade luminosa, diluição dos elementos nutritivos no meio de cultura, aplicação de agentes químicos, osmóticos e hormonais ao meio de cultura) na dependência do comportamento do material vegetal.

Os materiais enraizados, transferidos para casa de vegetação, e aclimatados (cf. **item 2.4**) serão mantidos em casa de vegetação, sendo também fonte de manutenção do banco de germoplasma *in vivo*.

2.5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para os experimentos de introdução *in vitro* do material vegetal será utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado. Para cada tratamento serão utilizadas 30 repetições, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio contendo um explante vegetal. Após a realização da análise da variância (ANOVA), as médias das porcentagens dos experimentos de assepsia e do uso de reguladores de crescimento (auxinas e citocininas) serão comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bajaj YPS (1995) Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In Bajaj YPS, ed, Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 32, Cryopreservation of plant germplasm I. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 3-28.
- Bastos LP, Moreira MJS, Costa MAPC, Rocha MC, Hansen DS, Silva SA, Dantas ACVL, Sousa CS (2007) Cultivo *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa*). Revista Brasileira de Biociências, v.5, supl.2, p.1122-1124.
- Berjak P, Pammenter NW (2004) Recalcitrant seeds. In: Benech-Arnold RL, Sánchez RA, eds. Handbook of seed physiology: applications to agriculture. New York: Haworth Press, pp 305–345.
- Borém A (2001) Melhoramento de plantas. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 300p.
- Chin HF, Roberts EH (1980) Recalcitrant Crop Seeds. Tropical Press Sdn Bhd. Kuala Lumpur, Malaysia.
- Ellis, RH Jenderek (2008) In: Cryopreservation of crop species in Europe – Cryoplanet 20-23 february, 2008. Agrifood Research Working papers 153. 69 p. Eds: Jaana Laamanen, Marjatta Uosukainen, Hely Haggman, Anna Nukari, Saija Rantala.
- Ellis RH, Hong TD, Roberts EH (1990) An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. J Exp Bot 41(230): 1167-1174.
- Ellis RH, Hong TD, Roberts EH (1991) An intermediate category of seed storage behaviour? II. Effects of provenance, immaturity, and imbibition on desiccation-tolerance in coffee. J Exp Bot 42(238): 653-657.
- Engelmann F (1991) *In vitro* conservation of tropical plant germoplasm review. Euphytica 57:227-243.

- Ferreira ME, Caldas LS, Pereira EA (1998) Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa - SPI/ Embrapa - CNPH, p. 21-44.
- George EF (1993) Plant propagation by tissue culture. 2 ed. Exegetic: Edington, 547 p.
- Grattapaglia D, Machado MA (1998) Micropropagação. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (Ed.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CNPH pp 183-260.
- Gupta PK, Durzan DJ (1987) Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. *Nature Biotechnology* 5: 147 – 151.
- Hägman H, Sutela S, Welander M (2007) Micropropagation of *Betula pendula* (Roth) including genetically modified material. In: Jain M, Häggman H. Propagation of Woody Trees and fruits 559 p.
- Harding K, Benson EE, Clacher K (1997) Plant conservation biotechnology: An overview. *Agro-Food Industry Hi-Tech* 8:24-29.
- Kartha KK (1985) Cryopreservation of plant cells and organs. Boca Raton CRC 276 p.
- Moraes RM, Caldas LS, Silveira CES, Souza AV, Bertoni BW, Pereira AMS (2007) Micropropagação e banco de germoplasma *in vitro* para produção e conservação de plantas nativas do Cerrado. In Pereira AMS (org) Recursos genéticos e conservação de plantas medicinais do Cerrado, Legis Summa, Ribeirão Preto, SP, Brazil, pp. 185-211.
- Panis B, Lambardi M (2006) Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). FAO, Rome, Italy. pp. 61-78.
- Roberts EH (1973) Predicting the storage life of seeds. *Seed Science & Technology* 1:499-514.
- Santos IRI (2000) Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 12:70-84.
- Stushnoff C (1987) Cryopreservation of apple genetic resources. *Canadian Journal of Plant Science* 67: 1151-1154.
- Walters C, Wheeler L, Grotenhuis JM (2005) Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Science Research* 15: 1–20.

Withers LA, Williams JT (1998) Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPq, p. 297-330.

II. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Etapas/ Atividades	Período	
	Primeiro semestre	Segundo semestre
Coleta de material vegetal	x	
Estabelecimento das culturas <i>in vitro</i>	x	x
Estabelecimento das condições de micropropagação	x	x
Estabelecimento das condições de manutenção e crescimento das plantas micropropagadas	x	x
Estabelecimento e manutenção do banco de germoplasma		x

III. CUSTEIO

a) Material de consumo

- **Vidraria para laboratório:** necessárias para acondicionamento e manutenção das culturas *in vitro*; preparo e armazenamento de meios e soluções; na montagem de experimentos e análises *in vitro*, bioquímicas, histoquímicas.
- **Reagentes:** reguladores de crescimento, agentes osmóticos, sais e vitaminas para preparo de meios de cultura, solventes, soluções para as análises histoquímicas, kits para análises moleculares.
- **Material plástico:** utilizado na manipulação, preparo de análises experimentais e acondicionamento para germinação e manutenção de sementes e plântulas.
- **Substratos:** necessários como base para germinação das sementes e manutenção das plântulas produzidas.

- b) **Serviços de terceiros:** suporte técnico de terceiros necessário para o desenvolvimento do projeto.

c) **Despesas com Transporte:** necessárias para auxiliar nos deslocamentos para realização das coletas de sementes.

d) **Bolsas de Iniciação Científica:** necessário para auxiliar na realização dos experimentos relacionados ao cultivo *in vitro* do material vegetal e estabelecimento do banco de germoplasma.

TIPO DE CUSTEIO	DESCRIÇÃO DO ITEM	VALOR ESTIMADO
Vidraria para laboratório	Tubos de ensaio, placas-de-petri, erlenmeyers, lâmina, lamínula, béqueres, provetas, etc.	R\$10.000,00
Reagentes	AIA, ABA, BAP, ANA, 2-IP, PEG, sorbitol, manitol, sacarose, gelrite, metanol, acetonitrila, kits histológicos, sais, vitaminas, kits para análises moleculares.	R\$10.000,00
Material plástico	ponteiras, microtubos, tubos falcon, luvas, recipientes para armazenamento, máscaras, cubetas, vasos, caixas e bandejas para germinação, etc.	R\$6.000,00
Substratos	areia, vermiculita, quartzo, terra	R\$3.400,00
Serviços de terceiros	coletas de sementes, consertos de equipamentos	R\$8.000,00
Despesas com transporte	passagens aéreas e/ou terrestres; combustível; táxis	R\$3.000,00
Bolsas de Iniciação Científica - IC	duas bolsas de IC para estudantes de graduação	R\$9.600,00*

*Valor unitário da bolsa de Iniciação Científica R\$400,00/ mês (Tabela CNPq)