

**SUSPENSÕES CELULARES DE MURICI-PEQUENO SUBMETIDAS À
CRIOPRESERVAÇÃO**

MILENE ALVES DE FIGUEIREDO CARVALHO¹, RENATO PAIVA²; RONY SWEENEN³,
DAIANE PEIXOTO VARGAS⁴, ANA CRISTINA DE SOUZA⁵, BART PANIS⁶

RESUMO

O gênero *Byrsonima*, especialmente a espécie *B. intermedia* (murici-pequeno), é um arbusto do Cerrado brasileiro que tem sido amplamente utilizado por suas características alimentares e terapêuticas. O objetivo deste trabalho foi realizar a criopreservação de diferentes linhagens celulares de *B. intermedia* submetidas ao congelamento lento. Diferentes linhagens de suspensões celulares de *B. intermedia*, as quais apresentavam diferentes colorações (amarela, branca, vermelha), condições de cultivo (escuro e luz) e formulações do meio de cultivo foram submetidas à criopreservação em nitrogênio líquido (-196°C) utilizando a técnica de congelamento lento. Após 30 dias de cultivo, o crescimento celular foi avaliado. A maioria das células tornaram-se completamente brancas após a criopreservação. Todas as células estavam aparentemente sem vida.

Palavras-chaves: *Byrsonima intermedia*, Células indiferenciadas, Congelamento lento, Preservação a longo prazo

INTRODUÇÃO

O gênero *Byrsonima*, composto de aproximadamente 150 espécies, pertence a família Malphiaceae e é amplamente distribuído na América Central e do Sul (AGUIAR et al., 2005). Suas cascas, folhas, flores e frutos são usados para fins medicinais, tais como anti-asmáticas e em infecções da pele (CACERES et al., 1993).

As culturas celulares podem fornecer meios para a síntese *de novo* de produtos naturais, bem como satisfatória bioconversão de compostos de baixo valor em produtos de alto valor, e, além disso, elas podem produzir novas substâncias fisiologicamente ativas que apresentem interesse medicinal, e que não são produzidas em plantas intactas (BHOJWANI & RAZDAN, 1996; VANISREE et al., 2004).

Células vegetais indiferenciadas, como por exemplo, suspensões celulares, são conhecidas por ser geneticamente instáveis. Culturas celulares produzindo metabólitos secundários tendem a perder sua produtividade durante prolongados cultivos *in vitro*. Para evitar eventos frequentes de longos subcultivos, métodos de preservação a longo prazo (como a criopreservação) são necessários (MANNONEN et al., 1990).

A criopreservação é a conservação de materiais vegetais em temperaturas ultra-baixas, que garante que todos os processos metabólicos sejam estabilizados. O nitrogênio líquido (NL) é o agente refrigerador mais comumente utilizado na criopreservação (GONZÁLEZ-BENITO et al., 2004; ZHU et al., 2006).

Com o objetivo de melhorar a sobrevivência celular e re-crescimento após criopreservação, condições de congelamento e descongelamento devem ser otimizadas para os diferentes tipos de células para limitar o estresse celular termal e osmótico (BERNEMANN et al., 2007). No presente trabalho, aplicou-se o protocolo de congelamento lento seguido por descongelamento rápido que é

¹ Pós-doutoranda em Agronomia/Fisiologia Vegetal, DBI/UFLA, migueiredo@yahoo.com.br

² Professor Associado, DBI/UFLA, renpaiva@dbi.ufla.br

³ Full Professor, Katholieke Universiteit Leuven, rony.swennen@biw.kuleuven.be

⁴ Pós-doutoranda em Agronomia/Fisiologia Vegetal, DBI/UFLA, dvbio@hotmail.com

⁵ Graduanda em Ciências Biológicas, DBI/UFLA, acstina@yahoo.com.br

⁶ Research Assistant, Katholieke Universiteit Leuven, bart.panis@biw.kuleuven.be

altamente efetivo para criopreservar suspensões celulares embriogênicas de bananeira no Laboratory of Tropical Crop Improvement, Leuven, Bélgica (PANIS et al., 1990).

Objetivou-se, no presente trabalho, criopreservar diferentes linhagens de suspensões celulares de murici-pequeno utilizando-se a técnica de congelamento lento.

MATERIAL E MÉTODOS

Criopreservação foi realizada de acordo com as técnicas desenvolvidas e usadas na criopreservação de bananeira no Laboratory of Tropical Crop Improvement da Katholieke Universiteit Leuven (KULeuven), Bélgica (PANIS et al., 2009).

O material vegetal utilizado foram suspensões celulares, oriundas de folhas de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia*), com 7-10 dias após o último subcultivo. Neste estágio, as células estavam na metade de sua fase exponencial. Diferentes colorações de suspensões (amarelo, branco e vermelho), condições de cultivo (escuro e luz) e meio de cultivo [meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 0,09M de sacarose e 2,26 μ M de 2,4-D x 4,65 μ M de cinetina (Meio M – meio de manutenção) ou 2,26 μ M de 2,4-D ou 4,52 μ M de 2,4-D] foram usados.

Sedimentação das células foi realizada em tubos de centrifugação graduados e o meio antigo removido. Novo meio de cultura M líquido com 0,5 M de sacarose foi adicionado até o volume final de células sedimentadas (SCV) de 30% (v/v) ser atingido. O mesmo volume de meio M + 0,5M de sacarose esterelizado contendo 15% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) foi gradualmente transferido para a suspensão celular concentrada por um período de uma hora à temperatura ambiente. Desta forma, a solução crioprotetora final continha 7,5% (v/v) de DMSO e 0,5M de sacarose.

Para o congelamento lento, criotubos contendo 2 mL de suspensões celulares crioprotetidas foram transferidos para um *container* de congelamento (NalgeneTM cryo 1°C - “Mr Frosty”). O *container* foi então transferido para o ultra-freezer (-80°C) que permitiu um congelamento a uma taxa de aproximadamente 1°C min⁻¹. Quando a temperatura atingiu -40°C, os criotubos foram imersos em nitrogênio líquido (-196°C) para armazenamento.

Após pelo menos 30 minutos de armazenamento, os criotubos foram rapidamente descongelados em um béquer completo com água destilada autoclavada à 40°C por aproximadamente 1,5 a 2 minutos, até que quase todo gelo estivesse derretido. Células descongeladas foram plaqueadas em meio de cultura semi-sólido (M ou MS com 3% de sacarose e livre de regulador de crescimento) em placas de Petri. Durante a primeira semana após a criopreservação, placas de Petri com papel filtro foram mantidas no escuro, sendo posteriormente transferidas para luz onde permaneceram por três a quatro semanas. Re-crescimento foi avaliado de acordo com sua capacidade de formação de calos (0, 25, 50, 75 e 100%).

O experimento foi conduzido com 5 repetições por tratamento e os valores avaliados pelos valores médios do erro padrão da média (S.E.M.). Os dados foram analisados usando o software Sisvar[®] (FERREIRA, 2000) e a significância estatística realizada pela ANOVA. Valores P menores que 0,01 foram considerados significantes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferentes linhagens de suspensões celulares de *B. intermedia*, as quais apresentavam diferentes colorações (amarela, branca, vermelha), condições de cultivo (escuro e luz) e meio de cultivo (meio M normal ou modificado) foram testadas e nenhum re-crescimento foi observado após criopreservação (Figura 1) independente da linhagem celular utilizada. A maioria das células se tornaram completamente brancas após a criopreservação (Figura 1 c,d), com exceção das células que apresentavam coloração avermelhada que se tornaram amarronzadas (dados não mostrados). Todas as células estavam aparentemente sem vida. Células do tratamento controle (sem crioprotetor e não criopreservadas) cultivadas em meio de cultivo sem o regulador de crescimento perderam sua habilidade de re-crescimento (Figura 1b).

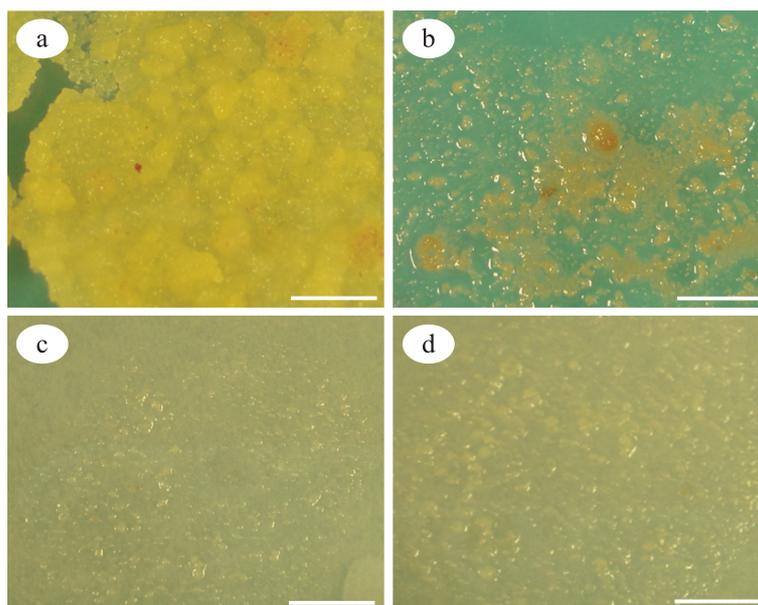


Figura 1 - Células da linhagem 1 (linhagem celular amarela cultivada no escuro) após 30 dias de cultivo. (a) tratamento controle em meio de cultivo suplementado com regulador de crescimento; (b) tratamento controle em meio de cultivo na ausência do regulador de crescimento; (c) criopreservação e em meio de cultivo suplementado com regulador de crescimento; (d) criopreservação e em meio de cultivo na ausência do regulador de crescimento. Barras = 5mm.

Culturas celulares indiferenciadas são muito sensíveis à estresses ambientais. Estes tecidos podem ser mais severamente injuriados através da desidratação imposta pelas soluções de vitrificação do que quando comparadas à desidratação induzida por congelamento durante o resfriamento a -30°C (KOBAYASHI et al., 2006).

Acredita-se que durante os estágios iniciais de congelamento, uma taxa mais lenta de congelamento da solução extracelular poderia reduzir o estresse causado na membrana plasmática (CHEN et al., 1984; MENGES & MURRAY, 2004).

O alto grau de vacuolização nas células resulta da falha de sobrevivência destas à criopreservação, principalmente devido ao seu alto conteúdo aquoso (LUO & WIDHOLM, 1997; MATHUR et al., 2003; MENGES & MURRAY, 2004). As células utilizadas no presente trabalho apresentaram alta vacuolização, predominante em quase todo o espaço intracelular (dados não mostrados). Essa característica poderia explicar os resultados obtidos com as linhagens celulares de murici-pequeno testadas.

CONCLUSÃO

Diferentes linhagens celulares de murici-pequeno submetidas à criopreservação pela técnica de congelamento lento não apresentam sinal de vida após 30 dias de cultivo.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, R. M.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. *Phytochemistry*, New York, v. 66, n. 9, p. 2388-2392, Oct. 2005.

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

- BERNEMANN, I.; HOFMANN, N.; SZENTIVANYI, A.; GLASMACHER, B. Strategy to improve cryopreservation protocols: a systematic parametric analysis for suspended cells. **Cryobiology**, San Diego, v. 55, n. 3, p. 338, Dec. 2007.
- BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. Production of secondary metabolites. In: BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. **Plant tissue culture: theory and practice**. Amsterdam: Elsevier, 1996. v. 5, p. 537-562.
- CACERES, A.; FIGUEROA, L.; TARACENA, A. M.; SAMAYOA, B. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory-diseases: (2) evaluation of activity of 16 plants against gram-positive bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 39, n. 1, p. 77-82, May 1993.
- CHEN, T. H. H.; KARTHA, K. K.; CONSTABEL, F.; GUSTA, L. V. Freezing characteristics of cultured *Catharanthus roseus* (L). G. Don cells treated with dimethylsulfoxide and sorbitol in relation to cryopreservation. **Plant Physiology**, Washington, v. 75, n. 3, p. 720-725, July 1984.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR – Sistema de análise de variância para dados balanceados, versão 4.0**. Lavras: UFLA, 2000.
- GONZÁLEZ-BENITO, M. E. G.; RAMÍREZ, I. C.; ARANDA, J. M. L. Review. The use of cryopreservation for germplasm conservation of vegetatively propagated crops. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 2, n. 3, p. 341-351, July/Sept. 2004.
- KOBAYASHI, T.; NIINO, T.; KOBAYASHI, M. Cryopreservation of tobacco BY-2 suspension cell cultures by vitrification with encapsulation. **Plant Biotechnology**, Sheffield, v. 23, n. 3, p. 333-337, Mar. 2006.
- LUO, X.; WIDHOLM, J. M. Cryopreservation of photosynthetic plant cell suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 47, n. 2, p. 183-187, June 1997.
- MANNONEN, L.; TOIVONEN, L.; KAUPPINEN, V. Effects of long-term preservation on growth and productivity of *Panax ginseng* and *Catharanthus roseus* cell cultures. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 9, n. 4, p. 173-177, Aug. 1990.
- MATHUR, G.; ALKUTKAR, V. A.; NADGAUDA, R. S. Cryopreservation of embryogenic culture of *Pinus roxburghii*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 46, n. 2, p. 205-210, Mar./Apr. 2003.
- MENGES, M.; MURRAY, J. A. H. Cryopreservation of transformed and wild-type *Arabidopsis* and tobacco cell suspension cultures. **The Plant Journal**, Oxford, v. 37, n. 4, p. 635-644, Feb. 2004.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.
- PANIS, B.; ENGELMANN, F.; BENSON, E. **Cryopreservation of musa germplasm**. Rome: Bioversity international, 2009. (Technical Guidelines, 9).
- PANIS, B.; WITHERS, L. A.; LANGHE, E. de. Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and subsequent regeneration of plants. **Cryo-Letters**, Cambridge, v. 11, n. 5, p. 337-350, Sept./Oct. 1990.
- VANISREE, M.; LEE, C. Y.; LO, S. F.; NALAWADE, S. M.; LIN, C. Y.; TSAY, H. S. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 45, n. 1, p. 1-22, July 2004.

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

ZHU, G. Y.; GEUNS, J. M. C.; DUSSERT, S.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Change in sugar, sterol and fatty acid composition in banana meristems caused by sucrose-induced acclimation and its effects on cryopreservation. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 128, n. 1, p. 80-94, Sept. 2006.