

**PRÉ-CULTIVO, PRÉ-TRATAMENTO E CONGELAMENTO LENTO NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SUSPENSÕES CELULARES DE *Byrsonima intermedia***

MILENE ALVES DE FIGUEIREDO CARVALHO¹, RENATO PAIVA², RONY SWENNEN³,
DAIANE PEIXOTO VARGAS⁴, BRENO RÉGIS SANTOS⁵, BART PANIS⁶

RESUMO

A espécie *Byrsonima intermedia*, conhecida popularmente como murici-pequeno, é amplamente utilizada como alimento e devido às suas propriedades medicinais. Objetivou-se com o presente estudo observar o efeito do crioprotetor DMSO (7,5%) como pré-tratamento, sacarose (0,4M) como pré-cultivo e a técnica de congelamento lento na criopreservação de suspensões celulares de *B. intermedia*. Suspensões celulares de coloração amarela foram submetidas à pré-cultivo em sacarose (0,4M) por três dias. Pré-tratamento com DMSO à 7,5% (v/v) e 0,5M de sacarose foi adicionado. Para o congelamento lento, quando a temperatura atingiu -40°C, os criotubos foram imersos em nitrogênio líquido (-196°C) para armazenamento. Após três a quatro semanas, o crescimento celular foi avaliado. A maioria das células tornou-se completamente branca após a criopreservação. Todas as células estavam aparentemente sem algum sinal de vida. Suspensões celulares de *B. intermedia* apresentaram coloração branca e não sobreviveram à criopreservação.

Palavras-chaves: Temperatura ultra-baixa, DMSO, Sacarose, Cultura de tecidos

INTRODUÇÃO

A medicina popular relacionada à *Byrsonima intermedia* relata que esta planta é conhecida por apresentar atividade antiúlcera e de cicatrização. Uma porção aquosa obtida a partir de folhas desta espécie foi eficaz na redução de uma lesão ulcerativa e também apresentou ação eficaz na cura da doença gástrica crônica (SANTOS et al., 2009).

A criopreservação é uma ferramenta fundamental não só para a conservação dos recursos genéticos, mas também para armazenamento de tecidos vegetais específicos que apresentam propriedades medicinais, exigindo um mínimo de espaço e de manutenção (JOSHI & TENG, 2000; URBANOVA et al., 2006; XUE et al., 2008, LAMBERT et al., 2009; LU et al., 2009; POPOVA et al., 2009).

Para que as células e tecidos vegetais sejam criopreservados com sucesso é fundamental otimizar cada etapa do procedimento experimental (URBANOVA et al., 2006) e compreender os princípios básicos da criobiologia (DAY et al., 2008). Esse sucesso pode ser caracterizado pela alta taxa de sobrevivência, manutenção das competências fisiológicas, capacidade de biossíntese e estabilidade genética (URBANOVA et al., 2006).

Para evitar a formação de gelo intracelular, o qual causa danos irreversíveis às membranas celulares destruindo sua semi-permeabilidade, muitos procedimentos estão disponíveis. Um deles é o resfriamento a uma taxa controlada que requer o controle da formação de gelo extracelular quando os cristais de gelo são iniciados (HELLIOT et al., 2003; PANIS & LAMBARDI, 2005; DAY et al., 2008; GONZALEZ-ARNAO et al., 2008). Outro procedimento usado para aumentar a tolerância de explantes à desidratação e posterior congelamento em nitrogênio líquido é a fase de pré-cultivo. A sacarose é frequentemente adicionada ao meio de cultura para esta finalidade (DANSO & FORD-

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 Professor Adjunto, Universidade Federal de Alfenas, brenors@yahoo.com.br

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

LLOYD, 2004; WANG et al., 2004; WINKELMANN et al., 2004; VERLEYSSEN et al., 2005a, b; WANG et al., 2005) devido aos seus efeitos sobre o teor de água das células e seus possíveis efeitos na proteção de proteínas e membranas (PANIS et al., 2006). O crioprotetor penetrante DMSO é um dos mais utilizados no pré-tratamento, por causa de sua penetração celular extremamente rápida (PANIS & LAMBARDI, 2005).

Objetivou-se com o presente trabalho verificar o efeito do crioprotetor DMSO (7,5%) como pré-tratamento, sacarose (0,4M) como pré-cultivo e a técnica de congelamento lento na criopreservação de suspensões celulares de *Byrsonima intermedia*.

MATERIAL E MÉTODOS

Criopreservação foi realizada de acordo com as técnicas desenvolvidas e usadas como rotina 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 de coloração amarela, oriundas de folhas de *Byrsonima intermedia*, com 7-10 dias após o último subcultivo e mantidas no escuro à $25 \pm 2^\circ\text{C}$. O meio de manutenção (meio M) das suspensões celulares foi o meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 0,09M de sacarose e $2,26 \mu\text{M}$ de 2,4-D x $4,65 \mu\text{M}$ de cinetina.

Para aumentar a tolerância das suspensões celulares ao congelamento, a fase de pré-cultivo foi incluída utilizando-se sacarose (0,4M) por três dias.

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. A toxicidade do crioprotetor DMSO (7,5% v/v) foi também observada no tratamento não submetido à criopreservação.

Para o congelamento lento, criotubos contendo 2 mL de suspensões celulares crioprotegidas 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 de 90 mm. Após a criopreservação, durante a primeira semana de cultivo, placas de Petri com papel filtro foram mantidas no escuro. Posteriormente, o material foi transferido 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

O efeito do pré-tratamento em DMSO (7,5%) por um período de uma hora em suspensões celulares de *B. intermedia* pode ser observado na Figura 1 (b,c). Células não submetidas à criopreservação, mas tratadas com DMSO praticamente não sobreviveram a esse tratamento (Figura 1b).

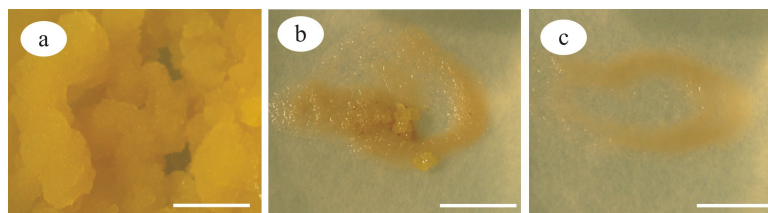


Figura 1 – Tratamento controle utilizando-se a técnica de congelamento lento em suspensões celulares de *Byrsonima intermedia* após 3-4 semanas de cultivo. (a) sem DMSO antes da criopreservação; (b) com DMSO antes da criopreservação; (c) com DMSO após criopreservação. Barras = 5mm.

O efeito do pré-cultivo com sacarose (0,4 M) por 3 dias em suspensões celulares de *B. intermedia* é mostrado na Figura 2. O pré-cultivo com sacarose provou ser tóxico mesmo antes do tratamento com DMSO e subsequente criopreservação (Figura 2). Todas as células se tornaram completamente brancas, sem algum sinal aparente de vida.

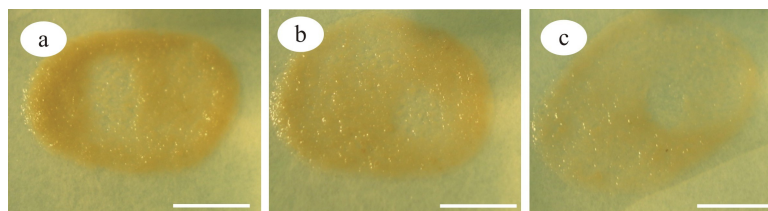


Figura 2 - Suspensões celulares de *Byrsonima intermedia* submetidas ao congelamento lento com pré-cultivo com sacarose (0,4M) por 3 dias e após 3-4 semanas de tratamento. (a) sem DMSO antes da criopreservação; (b) com DMSO antes da criopreservação; (c) com DMSO após criopreservação. Barras = 5mm.

Mathur et al. (2003) relatam que culturas embriogênicas de *Pinus roxburghii* submetidas ao congelamento lento e/ou criopreservação sem qualquer pré-tratamento com crioprotetores não apresentaram qualquer re-crescimento. Isto enfatiza a necessidade de proteger os tecidos com crioprotetores antes destes serem expostos à criopreservação. Esses autores também mostraram que a etapa de congelamento lento antes de imergir a cultura em nitrogênio líquido foi essencial para estas células.

Crioproteção de calos embriogênicos de laranjeira *Salustiana sweet* com 10% (v/v) de DMSO, resfriamento por congelamento lento ($0,1$ a $0,5^{\circ}\text{C min}^{-1}$) e descongelamento rápido foi adequado para recuperar o crescimento das culturas (PÉREZ et al., 1997).

Winkelmann et al. (2004) relataram que suspensões celulares de *Cyclamen persicum* cultivadas continuamente em meio padrão contendo 0,09 M de sacarose, não recuperaram seu crescimento após a criopreservação, mesmo após pré-tratamento com DMSO por uma hora. A combinação de pré-cultivo com açúcar (0,6 M) por 2 a 4 dias, seguido por pré-tratamento com DMSO (10%) por uma hora foi essencial para a sobrevivência das suspensões celulares desta espécie quando submetidas à criopreservação.

CONCLUSÃO

Suspensões celulares de *Byrsonima intermedia* não sobrevivem à criopreservação após pré-tratamento com DMSO (7,5%), pré-cultivo com sacarose (0,4M) e utilizando-se a técnica de congelamento lento.

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

- DANSO, K. E.; FORD-LLOYD, B. V. Cryopreservation of embryogenic calli of cassava using sucrose cryoprotection and air desiccation. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 22, n. 9, p. 623-631, Apr. 2004.
- DAY, J. G.; HARDING, K. C.; NADARAJAN, J.; BENSON, E. E. Cryopreservation - conservation of bioresources at ultra low temperatures. In: WALKER, J. M.; RAPLEY, R. (Ed.). **Molecular biotechnology handbook**. 2. ed. Totowa: Humana, 2008. p. 917-947.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR – Sistema de análise de variância para dados balanceados, versão 4.0**. Lavras: UFLA, 2000.
- GONZALEZ-ARNAO, M. T. G.; PANTA, A.; ROCA, W. M.; ESCOBAR, R. H.; ENGELMANN, F. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 1-13, Jan. 2008.
- HELLIOT, B.; SWENNEN, R.; POUMAY, Y.; FRISON, E.; LEPOIVRE, P.; PANIS, B. Ultrastructural changes associated with cryopreservation of banana (*Musa spp.*) highly proliferating meristems. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, n. 7, p. 690-698, Mar. 2003.
- JOSHI, A.; TENG, W. L. Cryopreservation of *Panax ginseng* cells. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 10, p. 971-977, Oct. 2000.
- LAMBERT, E.; GOOSSENS, A.; PANIS, B.; VAN LABEKE, M. C.; GEELLEN, D. Cryopreservation of hairy root cultures of *Maesa lanceolata* and *Medicago truncatula*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 96, n. 3, p. 289-296, Mar. 2009.
- LU, Z. W.; POPOVA, E. V.; WU, C. H.; LEE, E.-J.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Cryopreservation of *Ginkgo biloba* cell culture: effect of pretreatment with sucrose and ABA. **CryoLetters**, Bedfordshire, v. 30, n. 3, p. 232-243, Mar. 2009.
- 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.
- 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: Bioersivity international, 2009. (Technical Guidelines, 9).
- PANIS, B.; DUSSERT, S.; CARPENTIER, S.; GEUNS, J. M. C.; SWENNEN, R. Unraveling cryoprotection in banana: a physiological approach. **Cryobiology**, San Diego, v. 53, n. 3, p. 372, Dec. 2006.
- PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). **The Role of Biotechnology**, Turin, v. 5, n. 7, p. 43-54, Mar. 2005.

PÉREZ, R. M.; NAVARRO, L.; VILA, N. D. Cryopreservation and storage of embryogenic callus cultures of several *Citrus* species and cultivars. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 17, n. 1, p. 44-49, Nov. 1997.

POPOVA, E. V.; LEE, E. J.; WU, C. H.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. A simple method for cryopreservation of *Ginkgo biloba* callus. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 97, n. 3, p. 337-343, June 2009.

SANTOS, R. C.; SANNOMIYA, M.; PELLIZZON, C. H.; VILEGAS, W.; LIMA, C. A. H. Aqueous portion of *Byrsonima intermedia* A. Juss (Malpighiaceae): indication of gastroprotective and healing action of a medicinal plant from Brazilian Cerrado. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 75, n. 9, p. B24, July 2009.

URBANOVÁ, M.; KOŠUTH, J.; ČELLÁROVÁ, E. Genetic and biochemical analysis of *Hypericum perforatum* L. plants regenerated after cryopreservation. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 2, p. 140-147, Mar. 2006.

VERLEYSSEN, H.; BOCKSTAELE, E. V.; DEBERGH, P. An encapsulation-dehydration protocol for cryopreservation of the azalea cultivar 'Nordlicht' (*Rhododendron simsii* Planch.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 106, n. 3, p. 402-414, Oct. 2005a.

VERLEYSSEN, H.; FERNANDES, P.; SÁNCHEZ PINTO, I.; VAN BOCKSTAELE, E.; DEBERGH, P. Cryopreservation of *Robinia pseudoacacia*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 81, n. 2, p. 193-202, May 2005b.

WANG, Q.; LAAMANEN, J.; UOSUKAINEN, M.; VALKONEN, J. P. T. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 24, n. 5, p. 280-288, July 2005.

WANG, Q.; MAWASSI, M.; SAHAR, N.; LI, P.; VIOLETA, C. T.; GAFNY, R.; SELA, I.; TANNE, E.; PERL, A. Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) embryogenic cell suspensions by encapsulation-vitrification. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 77, n. 3, p. 267-275, June 2004.

WINKELMANN, T.; MUBMANN, V.; SEREK, M. Cryopreservation of embryogenic suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, n. 1/2, p. 1-8, Aug. 2004.

XUE, S. H.; LUO, X. J.; WU, Z. H.; ZHANG, H. L.; WANG, X. Y. Cold storage and cryopreservation of hairy root cultures of medicinal plant *Eruca sativa* Mill., *Astragalus membranaceus* and *Gentiana macrophylla* Pall. **Plant Cell and Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, n. 3, p. 251-260, Mar. 2008.