

TESTE DE TETRAZÓLIO EM EMBRIÕES CRIOPRESERVADOS DE MURICI-PEQUENO

GABRIELA FERREIRA NOGUEIRA¹, RENATO PAIVA², ANA CARLA RESENDE FRAIZ³,
ANA CRISTINA DE SOUZA⁴, DAIANE PEIXOTO VARGAS⁵, MILENE ALVES DE
FIGUEIREDO CARVALHO⁵

RESUMO

Objetivou-se neste trabalho avaliar a viabilidade dos embriões de murici-pequeno pelo teste de tetrazólio, após exposição ao nitrogênio líquido. Para a criopreservação, os embriões foram imersos em nitrogênio líquido por período de 7 dias na presença ou ausência dos crioprotetores – PVS2 modificado (40% glicerol + 45% sacarose + 10% etileno glicol + 10% DMSO) ou Solução B (meio de cultura MS + 0,4M sacarose + 8% DMSO). Após o descongelamento, a viabilidade dos embriões foi analisada pelo teste de tetrazólio. Os embriões foram pré-condicionados em BOD por 15 horas a 25°C e, em seguida, foram imersos em solução de tetrazólio a 0,2% por 8 horas a 25°C. Após o desenvolvimento da coloração, os embriões foram analisados individualmente e classificados em categorias de viáveis e inviáveis. O teste de tetrazólio foi eficiente na avaliação da qualidade fisiológica dos embriões de murici após exposição ao nitrogênio líquido. Verificou-se que os embriões criopreservados na presença dos crioprotetores PVS2 modificado e solução B apresentaram viabilidade significativamente inferior, 40% e 16% respectivamente, em relação aos embriões que não foram pré-tratados com estas soluções crioprotetoras (70%).

Palavras-chaves: *Byrsonima intermedia*, Crioprotetores, Conservação de germoplasma, Viabilidade celular

INTRODUÇÃO

O murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), espécie nativa do Cerrado Brasileiro, é um arbusto medicinal cujo chá da casca do caule apresenta atividade adstringente nas diarreias e disenterias. Contudo, a exploração extrativista e a baixa emergência das plântulas em campo têm colocado a espécie em risco eminente de extinção (NOGUEIRA, 2004).

A conservação *ex situ* é, muitas vezes, a única opção viável para evitar a extinção de espécies nativas e de grande interesse econômico. De acordo com Veiga et al. (2006), essa conservação desdobra-se em várias modalidades entre as quais destaca-se a criopreservação (PAIVA, 1994).

Contudo, a diversidade de respostas entre os diferentes tecidos de uma mesma espécie (SANTOS, 2001) ressalta a necessidade do aprimoramento das ferramentas tecnológicas que viabilize a criopreservação da espécie. Recentemente, com auxílio de algumas tecnologias é possível analisar o estresse e os danos causados aos tecidos após exposição a temperaturas ultra-baixas.

O teste de tetrazólio é descrito como um teste indireto utilizado para avaliar a viabilidade dos tecidos vegetais, permitindo um prognóstico rápido e preciso dos efeitos da criopreservação

¹ Doutoranda em Fisiologia Vegetal, DBI/UFLA, gabi_bioufla@hotmail.com

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

³ Mestranda em Engenharia Florestal, DCF/UFLA, anafranz@yahoo.com.br

⁴ Graduanda em Ciências Biológicas, Unilavras, acstina@yahoo.com.br

⁵ Pós-doutoranda em Agronomia/Fisiologia Vegetal, DBI/UFLA, dvbio@hotmail.com, migueiredo@yahoo.com.br

(MIKULA ET AL., 2006). Baseia-se na atividade enzimática de células vivas demonstrando o nível respiratório da amostra testada (WHITERS, 1985).

Neste contexto, objetivou-se neste trabalho avaliar a viabilidade celular dos embriões de murici-pequeno pelo teste de tetrazólio, após exposição ao nitrogênio líquido.

MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos maduros de murici-pequeno foram coletados no município de Ijaci- MG. Após a coleta, estes passaram por processo de beneficiamento, com retirada da polpa e lavagem em água corrente com auxílio de peneira por 10 minutos. Após a secagem, os frutos foram armazenados em sacos de papel a 10°C.

A abertura dos endocarpos foi realizada manualmente e, em seguida, os embriões zigóticos foram levados à câmara de fluxo laminar, imersos em álcool 70% por 30 segundos e, em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 1% de cloro ativo por 20 minutos. Ao final deste tempo, os embriões foram lavados em água destilada e autoclavada por três vezes.

Para a criopreservação os embriões foram submetidos aos seguintes tratamentos: imersão direta no nitrogênio líquido (NL) sem a presença de crioprotetores; pré-tratamento com as soluções crioprotetoras Solução B (meio de cultura MS + 0,4M sacarose + 8% DMSO) e PVS modificado (40% glicerol + 45% sacarose + 10% etileno glicol + 10% DMSO) (SAKAI ET AL., 1990) por 20 minutos. Os embriões de murici permaneceram no NL por 7 dias e, após esse período foram descongelados rapidamente em banho-maria a temperatura de $\pm 38^{\circ}\text{C}$.

No teste de tetrazólio, 30 embriões de cada tratamento foram pré-condicionados em água durante 15 horas em BOD a temperatura de 25°C. Em seguida, os embriões foram colocados em tubo de plástico sendo imersos na solução 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio a 0,2% e mantidos no escuro em BOD a 25°C por 8 horas. A fim de comparação, embriões não criopreservados também foram submetidos ao teste.

Após o desenvolvimento da coloração, os embriões foram lavados em água corrente e analisados individualmente quanto a intensidade de tons avermelhados, a presença de áreas brancas e localização destas colorações. Os embriões foram classificados individualmente em categorias de viáveis e inviáveis (Figura 1).

Categoria 1: embriões viáveis apresentaram coloração uniforme rosa e vermelho não muito intenso.

Categoria 2: embriões viáveis com coloração rosa claro ou pequenas regiões esbranquiçadas.

Categoria 3: embriões não viáveis apresentaram coloração branca em mais de 50% de sua extensão.

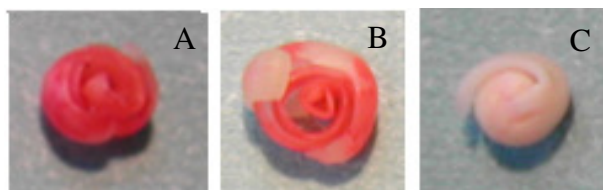


Figura 1 Categorias de embriões de *Byrsonima intermedia* submetidos ao teste de tetrazólio. A: categoria 1; B: categoria 2 e C: categoria 3.

O experimento foi conduzido segundo um delineamento inteiramente casualizado, constituído de 3 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por 10 embriões. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000), sendo as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

Para comparação dos resultados obtidos no teste de tetrazólio, foi realizada indução de calos nos embriões submetidos aos mesmos tratamentos (dados não publicados).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nas informações de intensidade de coloração e localização dos danos observou-se média de 87% de embriões viáveis (categoria 1 e 2) no tratamento controle, na qual, os embriões não foram criopreservados (Figura 2).

Com relação aos embriões de murici-pequeno criopreservados na ausência de soluções crioprotetoras observou-se média de 70% de viabilidade (categoria 2), mesmo após a exposição à temperatura de -196°C. Viabilidade significativamente superior aos embriões criopreservados na presença dos crioprotetores (Figura 2).

De acordo com a Figura 2, observou-se que quando os embriões foram criopreservados na presença das soluções PVS2 modificada e solução B, a viabilidade reduziu para 40% e 16%, respectivamente.

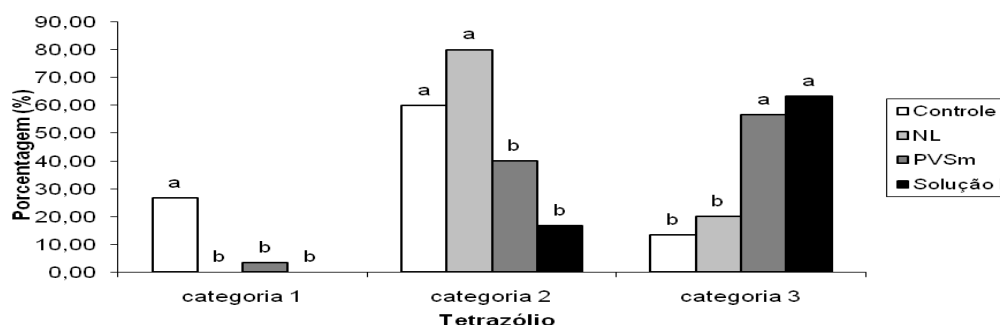


Figura 2 Porcentagem dos embriões de murici-pequeno criopreservados na presença ou ausência de crioprotetores dentro das diferentes categorias de classificação (Categoria 1: viáveis com coloração uniforme; Categoria 2: viáveis com manchas esbranquiçadas; Categoria 3: inviáveis).

Os crioprotetores são compostos químicos capazes de proteger os tecidos vegetais dos efeitos danosos causados pelos cristais de gelo, contudo, a exposição direta de amostras a estas soluções muitas vezes leva a efeitos prejudiciais aos tecidos devido à toxicidade causada pela sua elevada concentração (GONZALEZ- ARNÃO ET AL., 2008). O que possivelmente ocorreu neste experimento, onde verificou-se um efeito oposto ao esperado uma vez que os embriões reduziram a viabilidade em comparação como o tratamento sem crioproteção.

Veiga et al. (2006) demonstraram que a solução crioprotetora PVS2 não foi eficiente na proteção de sementes de *P. edulis* expostas ao NL. Nery (2008) relatou que eixos embrionários de *Anandenanthera colubrina* (Vell.) Brenan possivelmente embeberam as soluções crioprotetoras e a regeneração foi obtida somente quando os eixos foram criopreservados sem o uso desses crioprotetores químicos.

Estas informações obtidas pelo teste de tetrazólio podem elucidar os resultados encontrados na calogênese de murici-pequeno, a partir de embriões criopreservados (dados não publicados). Neste experimento, observou-se que não houve formação de calos quando os embriões de murici foram criopreservados na presença da solução B, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Assim, pode-se inferir que a formação de calos não foi possível devido à baixa taxa de viabilidade dos embriões após a criopreservação na presença da solução B.

Recentemente, o teste de CTT tem se destacado em múltiplas finalidades. Block & Brouwer (2002) relacionaram o vigor de algumas linhagens e híbridos de *B. napus* baseado na capacidade do material (explante) em reduzir o CTT. Silva (2009) utilizou o teste CTT na quantificação da viabilidade celular de calos de *Byrsonima intermedia*. Enquanto, Verleysen et al. (2004) e Mikula et al. (2006) avaliaram a viabilidade de ápices caulinares de *Azalea* e suspensões de *Gentiana* após a criopreservação.

CONCLUSÃO

O teste de tetrazólio foi eficiente na avaliação da qualidade fisiológica dos embriões de *Byrsonima intermedia* criopreservados.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

BLOCK, M. D.; BROUWER, D. D. A simple and robust in vitro assay to quantify the vigour of oilseed rape lines and hybrids. **Plant Physiology Biochemistry**, New Delhi, v. 40, n. 7, p. 845-852, June 2002.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar. 2000. p. 225-258.

GONZALEZ-ARNAO, M. T.; 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.

MIKULA, A.; NIEDZIELSKI, M.; RYBCZYNSKI, J. J. The use of TTC reduction assay for assessment of *Gentiana* spp. cell suspension viability after cryopreservation. **Acta Physiologiae Plantarum**, Poland, v. 28, n. 4, p. 315-324, Apr. 2006.

NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; CASTRO, A.H. DE; VIEIRA, C.V.; ABBADE, L.C.; ALVARENGA, A.A. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* a. juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1053-1059, 2004.

NERY, F.C. **Germinação, cultivo *in vitro* e tolerância ao congelamento de sementes de angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan)**. Universidade Federal de Lavras –Brasil (tese de doutorado), 2008. 217p.

PAIVA, J.R. Conservação ex situ de recursos genéticos de plantas na região tropical úmida. **Acta Amazônica**. v.24, n.1/2, p.63-80, 1994.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 20, maio/jun. 2001.

SILVA, L. C. **Viabilidade de células pró-embriogênicas e suspensão celular de murici-pequeno**. 2009. 104p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
VEIGA, R. F. de A.; MELETTI, L. M. M.; BARBOSA, W.; TOMBOLATO, A. F. C. A criopreservação de sementes de recursos genéticos hortícolas no Instituto Agrônomo (IAC). **O Agrônomo**, Campinas, v. 58, n. 1/2, p. 19-21, jan. 2006.

VERLEYSSEN, H.; SAMYN, G.; VAN BOCKSTAELE, E.; DEBERGH, P. Evaluation of analytical techniques to predict viability after cryopreservation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 77, n. 1, p. 11-21, Apr. 2004.

WHITERS, L. A. Cryopreservation of cultured plant cells and protoplasts. In: VASIL, J. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. Orlando: Academic, 1985. p. 253-316.