



JORGE MARCELO PADOVANI PORTO

**CRIOPRESERVAÇÃO DE CALOS, ÁPICES
CAULINARES E SEMENTES DE BARBATIMÃO**

**LAVRAS – MG
2013**

JORGE MARCELO PADOVANI PORTO

**CRIOPRESERVAÇÃO DE CALOS, ÁPICES CAULINARES E
SEMENTES DE BARBATIMÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Lavras como parte das exigências do
Curso de Doutorado em Agronomia, área
de concentração em Fisiologia Vegetal,
para a obtenção do título de "Doutor".

Orientador
Renato Paiva, PhD

Co-orientadora
Dra. Raírys Cravo Herrera

LAVRAS - MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Porto, Jorge Marcelo Padovani.

Criopreservação de calos, ápices caulinares e sementes de
barbatimão / Jorge Marcelo Padovani Porto. – Lavras : UFLA, 2013.
115 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Renato Paiva.

Bibliografia.

1. *Sthryphnodendron adstringens*. 2. Plantas medicinais. 3.
Criobanco. 4. Crioprotetores. 5. Cultivo *in vitro*. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.322

JORGE MARCELO PADOVANI PORTO

**CRIOPRESERVAÇÃO DE CALOS, ÁPICES CAULINARES E
SEMENTES DE BARBATIMÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 28 de Fevereiro de 2013.

Antonio Chalfun Júnior, PhD	UFLA
Dr. Antonio Paulino da Costa Netto	UFG
Dra. Fernanda Carlota Nery	UFSJ
Dr. Guilherme Augusto Canella Gomes	IFSP

Renato Paiva, PhD
Orientador

Dra. Raírys Cravo Herrera
Co-orientadora

**LAVRAS – MG
2013**

À Deus e aos meus amados pais, Jorge Porto e Antônia Aparecida
Padovani Porto.

OFEREÇO

Ao meu irmão Rodrigo,
à minha família,
à minha “Linda”, Rafaeli,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jorge Porto e Antônia Aparecida Padovani Porto cujo amor e incentivo proporcionaram todas as minhas realizações.

Ao meu irmão Rodrigo que sempre me deu força em relação as minhas decisões.

A toda minha família que sempre me apoiou.

À minha “Linda”, Rafaeli, por todo amor e compreensão.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Professor Renato Paiva, por me proporcionar esta conquista e pelos conselhos que levarei para o resto de minha vida.

Aos membros da banca examinadora.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal pelos conhecimentos adquiridos durante o curso.

Ao Prof. Geraldo Alves da Silva, pela análise fitoquímica.

À doutoranda Ana Catarina Lima Oliveira pela análise no citômetro de fluxo.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas: Tina, Diogo, Luciano, Maísa, Paulo, Danielly, Mayara, Mário, João Gabriel, Fernanda, Ana Luísa, Cibele, Mário, Rodrigo, pela colaboração e amizade.

Ao meu amigo Alvinho, responsável pela minha inclusão no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas - Setor de Fisiologia Vegetal – UFLA.

Aos funcionários técnico-administrativos: Joel, Lena, Tina, Emanuelle, Barrinha e Odorêncio, pelo auxílio e amizade.

Aos meus amigos Franciane, Anderson, Emily e Thiago pelos ótimos momentos que vivenciamos juntos.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma, para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

Jorge Marcelo Padovani Porto, filho de Jorge Porto e Antônia Aparecida Padovani, nasceu em Varginha, Minas Gerais, em 27 de março de 1982. cursou o ensino fundamental na Escola Cooperativa Gralha Azul (Lavras-MG) e o médio, na Escola Estadual João Batista Hermeto (Lavras-MG), concluindo-o em 1999. Em 2000, foi aprovado no vestibular para o curso de Ciências Biológicas-Licenciatura do Centro Universitário de Lavras (UNILAVRAS), concluído em 2003. No ano de 2006, foi bolsista de apoio técnico pelo CNPq no laboratório de cultura de tecidos do Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA) sob a orientação do Prof. Renato Paiva. Em março de 2007, iniciou o mestrado em Agronomia - Fisiologia Vegetal na UFLA, sob a orientação da Profa. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, concluindo-o em fevereiro de 2009. Em março deste mesmo ano ingressou no doutorado pelo mesmo programa, sob a orientação do Prof. Renato Paiva, PhD e o concluiu em 28 de fevereiro de 2013.

RESUMO GERAL

O barbatimão [*Sthyphnodendron adstringens* (Mart.) coville] é uma planta encontrada no Cerrado brasileiro e possui diferentes ações medicinais em face da alta concentração de taninos em diferentes partes da planta. A criopreservação é um método bastante utilizado na conservação de propágulos vegetativos de interesse medicinal e comercial e, assim, o presente estudo foi realizado com o objetivo de propor metodologias de criopreservação de calos, ápices caulinares e sementes de barbatimão. Calos provenientes de folhas cotiledonares foram induzidos em meio MS suplementado com combinações entre concentrações de 2,4-D e TDZ e entre concentrações de cinetina e picloram. Após a indução, realizou-se a quantificação de fenóis totais e determinou-se a curva de crescimento dos calos. Para a criopreservação, foram utilizados calos induzidos com 1 mg L^{-1} de 2,4-D. Para a criopreservação dos ápices caulinares, primeiramente testou-se a influência do BAP e do GA_3 na cultura deste explante. Na criopreservação utilizou-se a técnica de “droplet-vitrification”, onde os ápices ficaram expostos ao PVS2 por diferentes períodos de tempo antes da imersão em nitrogênio líquido. Diferentes concentrações de BAP e GA_3 foram utilizadas no cultivo dos ápices após a criopreservação. Para a criopreservação de sementes, primeiramente determinaram-se três diferentes teores de água nas sementes. Após a imersão e descongelamento das sementes, avaliou-se a porcentagem de germinação, o vigor das sementes e a quantidade de DNA entre os diferentes tratamentos testados. Os calos obtiveram maiores valores de fenóis totais em meio MS com 1 mg L^{-1} de 2,4-D e 2 mg L^{-1} de cinetina e 1 mg L^{-1} de picloram. A curva de crescimento indicou que a repicagem dos calos deve ser realizada aos 49º dia de cultivo. Os diferentes ensaios de criopreservação de calos não apresentaram retomada do crescimento para nenhum tratamento. A concentração de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP proporcionou maior comprimento de ápices caulinares. Os períodos de 15 e 30 minutos de exposição dos ápices ao PVS2 apresentaram maiores porcentagens de sobrevivência e a combinação de GA_3 com 2 mg L^{-1} de BAP os maiores comprimentos das brotações. As sementes criopreservadas apresentaram a mesma quantidade de DNA, e as sementes com 6 e 9% de teor de água apresentaram plântulas com maiores comprimentos de parte aérea e peso da matéria seca das plântulas. Conclui-se que é possível criopreservar ápices caulinares e sementes de barbatimão. Os calos contêm a presença de fenóis totais, mas sua criopreservação precisa de mais estudos.

Palavras-chave: Cerrado; planta medicinal; calogênese; “droplet-vitrification”; teor de água.

GENERAL ABSTRACT

Barbatimão [*Sthyphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] is a medicinal plant found in the Brazilian Cerrado. The species presents different medicinal functions due to high concentration tannin in different parts of the plant. Cryopreservation is a widely used method in the conservation of vegetative explants of species with medicinal and commercial interest. The aim of the present study was to develop protocols for cryopreservation of barbatimão calluses, shoot tips and seeds. Cotyledon segments were used to induce calluses in MS medium supplemented with different combinations of 2,4-D × TDZ and between concentrations of kinetin × picloram. For cryopreservation, we used calluses with 1 mg L⁻¹ of 2,4-D. For the cryopreservation of the shoot tips, we first tested the influence of BAP and GA₃ in the shoot tips' growth. The "droplet-vitrification" technique was used for shoot tips' cryopreservation, where the explants were exposed to PVS2 for different periods of time before being plunged into liquid nitrogen. Different BAP and GA₃ concentrations were tested in the shoot tips' cultivation after cryopreservation. For the cryopreservation of the seeds, we first assessed the water content of three different seeds. After plunging the seeds into LN and thawing the percentage of germination, seed vigor and the amount of DNA between different treatments was evaluated. The best results were obtained for the callus formation at the concentrations of 0.5 and 2.0 mg L⁻¹ TDZ, in the absence of 2,4-D or using 2.0 mg L⁻¹ kinetin combined with 0.5 mg L⁻¹ of picloram. The highest amount of phenols were quantified in a medium containing 1.0 mg L⁻¹ of 2,4-D, 2.0 mg L⁻¹ of kinetin and 1.0 mg L⁻¹ of picloram. The growth curve indicated that callus grading must be performed at 49 days of cultivation. The different callus cryopreservation assays did not show regrowth in any of the treatment. The concentration of 0.25 mg L⁻¹ of BAP promoted the largest height of the shoot tips. The periods of 15 and 30 minutes of shoot tips exposure to PVS2 presented higher survival percentages and the combination of GA₃ with 2.0 mg L⁻¹ of BAP presented the largest shoot lengths. Cryopreserved seeds showed the same amount of DNA, and seeds with 6 and 9% water content showed greater vigor. We conclude that it is possible to induce calluses from cotyledons using different auxins and cytokinins and that these calluses contain phenols. The cryopreservation methodology used in this study was not successful with calluses. The BAP is essential for shoot tip culture, and GA₃ for shoot elongation. The "droplet-vitrification" technique can be used for the cryopreservation of shoot tips. Seeds with low amounts of water can be successfully cryopreserved.

Keywords: Cerrado; medicinal plant; calluses induction; "droplet-vitrification"; water content

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	Introdução geral.....	13
1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Descrição da espécie <i>Stryphnodendron adstringens</i>	16
2.2	Propriedades medicinais do barbatimão	18
2.3	Cultura de Calos e Produção de Compostos Fitoquímicos <i>in vitro</i>	19
2.4	Criopreservação.....	21
2.5	Criopreservação de sementes	24
2.6	Criopreservação de meristemas.....	25
2.7	Criopreservação de calos	27
2.8	Citometria de fluxo.....	29
	REFERÊNCIAS	30
CAPÍTULO 2	Indução, determinação de fenóis totais e criopreservação de calos de barbatimão.	38
	RESUMO.....	38
	ABSTRACT.....	40
1	INTRODUÇÃO	41
2	MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1	Material vegetal.....	43
2.2	Indução de calogênese	43
2.3	Determinação de fenóis totais	44
2.4	Curva de crescimento de calos	45
2.5	Criopreservação de calos	46
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.1	Indução de calogênese	49

3.2	Determinação de fenóis totais	54
3.3	Curva de crescimento de calos	57
3.4	Criopreservação de calos	59
4	CONCLUSÕES.....	62
	REFERÊNCIAS	63
	CAPÍTULO 3 Cultivo <i>in vitro</i> e criopreservação de ápices caulinares de barbatimão	67
	RESUMO.....	68
	ABSTRACT.....	69
1	INTRODUÇÃO	70
2	MATERIAL E MÉTODOS	72
2.1	Material vegetal.....	72
2.2	Cultivo <i>in vitro</i> de ápice caulinar	73
2.3	Regeneração dos ápices caulinares.....	73
2.4	Tratamento com PVS2 e criopreservação	73
2.5	Teste com diferentes meios de cultura.....	74
2.6	Teste com GA ₃	75
2.7	Análises estatísticas	75
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
3.1	Cultivo <i>in vitro</i> de ápice caulinar	76
3.2	Regeneração dos ápices caulinares.....	79
3.3	Tratamento com PVS2 e criopreservação	80
3.4	Teste com diferentes meios de cultura.....	84
3.5	Teste com Ga ₃	86
4	CONCLUSÕES.....	88
	REFERÊNCIAS	89
	CAPÍTULO 4 Determinação do teor de água para a criopreservação de sementes de barbatimão.....	94

RESUMO.....	94
ABSTRACT.....	95
1 INTRODUÇÃO.....	96
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	99
2.1 Material vegetal.....	100
2.2 Criopreservação de sementes.....	100
2.3 Teste de germinação.....	101
2.4 Teste de vigor.....	102
2.5 Análise de conteúdo de DNA.....	103
2.6 Delineamento experimental e análise estatística.....	104
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	104
4 CONCLUSÕES.....	111
REFERÊNCIAS.....	112

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, ocupando cerca de 23% do território nacional, estando presente em 13 estados. Possui a mais rica flora dentre as savanas do mundo, com alto nível de endemismo, especialmente quando se consideram as espécies lenhosas. É um dos 'hotspots' para a conservação da biodiversidade mundial, no qual boa parte dos seus dois milhões de km² originais foi devastada.

A ocupação do Cerrado ocorreu em diferentes momentos e velocidades. Nos anos recentes, entretanto, as pressões sobre o Cerrado começaram a ter outras origens e o extrativismo intensivo de plantas nativas tem levado a reduções drásticas das populações naturais. Assim, é preciso considerar que os recursos naturais oferecidos pelo Cerrado poderão estar indisponíveis às futuras gerações com o crescimento do extrativismo predatório. Entre estes, pode-se considerar o recurso terapêutico oferecido pelas plantas medicinais (GUARIM NETO; MORAIS, 2003).

No elenco das espécies úteis do Cerrado, algumas têm destaque quanto ao seu valor medicinal e dentre elas, o barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] que é amplamente utilizada como anti-séptico, bactericida e tripanocida (HERZOG-SOARES et al., 2002).

Neste contexto, a utilização de técnicas de cultura de tecidos vegetais tem colaborado expressivamente para o avanço do processo de propagação de espécies lenhosas. Destaca-se a calogênese empregada na multiplicação de genótipos superiores em larga escala, em curto espaço de tempo. A utilização dessa técnica em plantas pode resolver alguns problemas relacionados com a produção de metabólitos secundários de origem vegetal. O cultivo de calos e células tem facilitado a elucidação dos fatores que interferem no metabolismo secundário, tendo em vista a produção de compostos de importância para a

indústria farmacêutica que podem ser otimizados por meio do uso de estimuladores (SOUSA; SILVA; MIRANDA, 2007).

Bancos de germoplasma a campo e bancos de genes *in vitro* são de longa data utilizados para a conservação, entretanto, estes são caros e susceptíveis a ataques de pragas e doenças. Os esforços para conservar o germoplasma a médio/curto prazo, de acordo com o crescimento lento *in vitro*, também são caros e requerem mão de obra qualificada. A criopreservação, por outro lado, é uma técnica muito segura e eficaz para a conservação em longo prazo dos recursos genéticos, principalmente para culturas de espécies propagadas vegetativamente ou que possuem sementes recalcitrantes (ENGELMANN & ENGELS, 2002), oferecendo, portanto, uma alternativa viável para o armazenamento de longo prazo, e assegurar a recuperação do germoplasma (GONZALEZ-ARNAO et al., 1999).

A otimização do protocolo de indução e criopreservação de calos, ápices caulinares e das sementes de barbatimão viabilizará a produção de metabólitos secundários *in vitro* dessa espécie, em especial taninos, auxiliará na conservação de germoplasma de forma segura em nitrogênio líquido e estimulará a exploração racional desse recurso genético, incentivando a indústria de fitoterápicos e, conseqüentemente, uma maior demanda de mão-de-obra para a manipulação de cultivos desta planta medicinal.

Neste contexto, este trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver metodologias de cultivo *in vitro* e criopreservação de barbatimão.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Descrição da espécie *Stryphnodendron adstringens*

A espécie [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] é uma planta medicinal do Cerrado, pertencente à família Fabaceae e conhecido popularmente como barbatimão. Possui elevados teores de compostos polifenólicos na casca, especialmente taninos, em concentrações que variam de 20% a 30% (LIMA; MARTINS; SOUZA JÚNIOR, 1998). Possui grande distribuição e importância econômica para o Estado de Minas Gerais e é popularmente empregado como cicatrizante e adstringente (LOPES et al., 2005). No Brasil, a produção de casca de barbatimão vem sofrendo uma queda desde 1988, principalmente no sul de Minas Gerais, em razão de sua utilização pelas indústrias de curtimento do couro (ALMEIDA et al., 1998).

O barbatimão é uma árvore de quatro a seis metros de altura, tronco com diâmetro de 20 a 30 centímetros e casca grossa e rugosa, decídua e heliófita (GILBERT; FERREIRA; ALVES, 2005). É monoica e produz pequenas quantidades de néctar nas flores, o que atrai pequenos insetos, como *Apis melifera*, *Bombus spp.*, moscas Tabanidae e, especialmente, abelhas Meliponinae, atuando como principais polinizadores (FELFILI et al., 1999). Seus ramos são tortuosos, revestidos de pouca folhagem, folhas bipinadas de cinco a oito jugos, folíolos alternados de seis a oito jugos (Figura 1).



Figura 1 Imagem da árvore (A), das folhas e flores (B), das vargens (C) e das sementes (D) de barbatimão (LORENZI, 2000).

É considerada planta perene, florescendo de outubro a fevereiro e frutificando de outubro a março. Apresenta inflorescências com número variável de flores pequenas, dispostas em formato de espiga. Seu fruto, uma vagem sésil e grossa de dez centímetros de comprimento é indeiscente e amadurece entre julho e setembro (LORENZI, 2000). Segundo Felfili et al. (1999), a *Stryphnodendron adstringens* é uma planta de baixa exigência nutricional e consegue se desenvolver em solos degradados. Mas segundo Barradas e Handro (1974), a árvore apresenta uma grande quantidade de vagens e sementes, no entanto, a germinação é bastante irregular, como consequência da dormência tegumentar. Além disso, o ataque de pragas em suas sementes diminui significativamente sua propagação natural.

2.2 Propriedades medicinais do barbatimão

O barbatimão é constituído por diferentes substâncias químicas como: taninos, flavonoides, alcaloides, proantocianidinas, matérias resinosas, mucilaginosas, saponinas e corantes (SIMÕES et al., 1999). Em análise dos principais componentes extraídos do barbatimão (SANTOS et al., 2006), há uma tendência de maior produção de taninos na estação quente e chuvosa, sugerindo que os fatores ambientais podem afetar os teores de taninos nestas espécies.

A principal utilização de valor econômico do barbatimão é a extração de tanino, tendo uma produção média de material tanante da casca de 20% a 30% que é utilizado na medicina popular, no tratamento de úlceras e na indústria de curtume, petrolífera, plástica e de resinas como fixador para tintas e corantes (MONTEIRO; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2005). Os estudos farmacológicos com esta planta demonstraram que ela possui propriedades antiinflamatórias (LIMA; MARTINS; SOUZA JÚNIOR, 1998) e de proteção das mucosas gástricas (AUDI et al., 1999.). Há também relatos de que extratos de barbatimão possuem efeito antimicrobianos (ISHIDA et al., 2006), antiviral (FELIPE et al., 2006), cicatrizante, antioxidante (LOPES et al., 2005) e antiprotozoária (HOLETZ et al., 2005).

Herzog-Soares et al. (2002) comprovaram que extratos de barbatimão mostraram ação tripanocida, com inibição do crescimento de 51,9% de *Trypanosoma cruzi in vivo*, podendo ser uma fonte alternativa de composto clinicamente ativo contra este parasita.

Além do efeito medicinal dessa planta, é possível que o extrato seja empregado também na agricultura. Petacci et al. (2001) sugeriram que o barbatimão pode ser um forte candidato para a obtenção de compostos bioativos que agem como herbicidas ao testarem o potencial fitotóxico e alelopático de

uma espécie do mesmo gênero, a *Stryphnodendron polyphyllum*, sobre a germinação de sementes de hortaliças.

2.3 Cultura de Calos e Produção de Compostos Fitoquímicos *in vitro*

A calogênese é induzida de maneira indireta a partir de explantes iniciais que podem ser, por exemplo, segmentos foliares, caulinares, raízes, entre outros. Na organogênese *in vitro* pode-se ter a via de regeneração direta com a formação de tecidos ou órgãos ou a via indireta passando pela fase de calos.

Os calos são considerados a formação de um novo sistema de diferenciação, apresentando arranjos específicos das células que o constitui, gerado em função do balanço de nutrientes, fitorreguladores e das características das células que lhe deram origem (TERMIGNONI, 2007). Desenvolvem-se a partir de um pequeno pedaço de órgão de determinada planta e têm a capacidade de se diferenciar em tecidos, órgãos e até embriões, podendo regenerar plantas inteiras (PIERIK, 1990).

A formação de calos depende de fatores importantes, como a seleção do explante, meio de cultura adequado e condições ambientais. Segundo Vietez e San-José (1996), muitas vezes é necessário o suprimento exógeno de reguladores de crescimento para a indução de calos. O balanço hormonal obtido entre os níveis de citocininas e auxinas, exógenas e endógenas ao explante, pode estimular a proliferação celular.

O estabelecimento da curva de crescimento de calos de determinada espécie permite a identificação das fases distintas de crescimento dessa estrutura. Segundo Smith (1992), a fase lag se caracteriza como fase de maior produção de energia, correspondendo ao período em que as células se preparam para a divisão, visando a sua expansão. Ocorre o início da mobilização de

metabólitos sem qualquer divisão celular, síntese de proteínas e de compostos específicos. Esta fase resulta em um pequeno crescimento dos calos. A fase exponencial é biossintética. Observa-se maior crescimento dos calos, em virtude da máxima taxa de divisão celular, característica desse período. O número de células aumenta. A fase linear caracteriza-se pela redução da divisão celular e aumento de volume celular. A fase de desaceleração é o momento em que as culturas devem ser transferidas para outro meio, face à redução de nutrientes, produção de produtos tóxicos e redução do oxigênio no interior das células. Na fase estacionária, ocorre maior acúmulo de metabólitos secundários.

Ao determinar a curva de crescimento dos calos, pode-se estabelecer o momento exato de repicagem para um meio fresco ou a possibilidade da sua utilização em suspensões celulares, podendo visar à produção de metabólitos secundários em espécies medicinais (SMITH, 1992).

A cultura de calos representa uma fonte potencial renovável de muitos destes produtos naturais (medicinais, sabor, essências, entre outros). Porém, atualmente, poucas culturas produzem estes compostos em quantidades úteis comercialmente, sendo necessários mais estudos visando à otimização deste processo de produção, bem como para a quantificação e a extração desses produtos.

A utilização de 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) nos estudos de plantas medicinais *in vitro* para a propagação e produção de metabólitos secundários tem se destacado. Princípios ativos foram detectados em suspensão celular obtidas de calos de *Gymnema sylvestre* induzidos em meio de cultura contendo 2,4-D (GOPI; VATSALA, 2006).

Segundo Niciole et al. (2008), o meio de cultura MS suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de picloram induz calos com maiores valores de matéria fresca. Os autores também verificaram que os calos induzidos na ausência de reguladores de crescimento apresentam maiores teores de fenóis e taninos totais, com valores

médios de 9,58% e 2,36%, respectivamente. Calos com maiores valores de matéria fresca apresentam menores teores de fenóis e ausência ou baixas concentrações de taninos totais.

O crescimento de células em ambiente totalmente controlado com relação a fatores químicos e físicos promove um excelente ambiente para estudar mudanças no metabolismo secundário, os quais quase sempre são produzidos em pequenas quantidades (PEREIRA; PEREIRA; JUNQUEIRA, 2001).

2.4 Criopreservação

Para a conservação do material *in vitro* existem dois métodos principais, o crescimento lento e a criopreservação. No primeiro, há necessidade de subculturas periódicas de brotos e segmentos nodais, com maior custo de manutenção (SANTOS, 2001). A criopreservação é a conservação de material biológico sob condições ultrabaixas de temperaturas em nitrogênio líquido a -196°C, ou em sua fase de vapor a -170°C. Todas as reações químicas, processos biológicos, bem como as atividades intra e extracelulares são suspensas, sendo a maneira mais promissora de armazenamento em longo prazo para células, tecidos e órgãos vegetais (CARVALHO; VIDAL, 2003).

No método de criopreservação ocorre uma redução do metabolismo, impedindo assim, a deterioração do material biológico. É um método prático e de baixo custo quando comparado a todas as técnicas aplicadas de coleta, germinação e novos lotes introduzidos periodicamente em banco de germoplasma convencional (LACERDA et al., 2002).

Os métodos de criopreservação podem ser desdobrados em etapas conhecidas como: pré-crescimento, crioproteção, resfriamento, armazenamento,

descongelamento e recuperação do crescimento (WITHERS; WILLIAMS, 1998). Estes métodos foram utilizados para o armazenamento de vários tipos diferentes de materiais vegetais, tais como sementes, eixos embrionários isolados de sementes e material vegetativo de plantas propagadas, incluindo gemas apicais ou axilares, pólen, embriões somáticos e tecidos embrionários (HIDEYUKI et al., 2009; LISHENG; PATRICK, 2011; SALAJ et al., 2011).

Segundo Sakai (1995), algumas perspectivas positivas quanto à criopreservação de culturas *in vitro*, tais como, evitar a variação somaclonal e gametoclinal (as técnicas criobiológicas podem prevenir os efeitos prejudiciais em espécies que permaneçam *in vitro* por sucessivos subcultivos que sofrem alterações na estabilidade genética); a propagação vegetativa e uniforme (os clones propagados dependem de uma ocupação espacial no laboratório, além do risco de exposição a patógenos e à perda do germoplasma mantido *in vitro*); sementes recalcitrantes (muitos germoplasmas são conservados pelas sementes, porém, muitas espécies importantes economicamente apresentam sementes recalcitrantes e, nestes casos a criopreservação de embriões ou tecidos torna-se uma importante ferramenta para conservação da diversidade genética que não pode ser preservada mediante a manutenção das suas sementes); a conservação de germoplasmas raros (nestes casos, enquadram-se espécies ameaçadas de extinção no habitat natural ou plantas pilotos para manipulação genética; tais como: espécies híbridas ou transformadas geneticamente, entre outros); manutenções de linhagens de células medicinais (algumas suspensões celulares que produzem uma quantidade importante de produtos de interesse farmacológicos podem ser criopreservadas para manutenção do potencial biossintético).

O grande desafio na criopreservação é impedir a cristalização da água intracelular, que pode ocorrer durante o resfriamento ou descongelamento.

Durante o descongelamento, a cristalização de uma solução vitrificada é denominada recristalização. Tanto a cristalização ou a recristalização são letais. A chave para o sucesso da criopreservação está, em maior grau de importância, na tolerância a desidratação do que na tolerância ao processo de congelamento em si (GONZÁLEZ-ARNAO et al., 2008; HELLIOT et al., 2003; WANG et al., 2004).

No processo de congelamento da água existem dois tipos de nucleação: homogênea e heterogênea. A nucleação homogênea é um processo que ocorre espontaneamente durante o esfriamento da água a uma temperatura inferior ao ponto de fusão da fase cristalina pura (gelo). Para a água pura, esta temperatura é de cerca de -40°C . Este tipo de nucleação é um processo termodinâmico, simultâneo com a formação de gelo, no qual a energia exotérmica é libertada. A nucleação heterogênea é a formação de núcleos de gelo sobre uma superfície catalítica. A perda de viabilidade pós-descongelação é normalmente causada por lesões celulares que ocorrem durante a transição rápida da água extra e intracelular resfriada em gelo. Assim, para evitar a formação de gelo intracelular, o que provoca danos irreversíveis às membranas das células, muitos procedimentos estão disponíveis. Um procedimento é o resfriamento a uma taxa controlada, que requer o controle de formação de gelo extracelular quando os cristais de gelo são iniciados (GONZÁLEZ-ARNAO et al., 2008; PANIS; LAMBARDI, 2005).

Existem muitas técnicas de criopreservação que garantem alta recuperação de propágulos, minimizando a desidratação e danos pelo congelamento. Entre eles, o congelamento lento, a secagem ao ar, a vitrificação, encapsulamento-desidratação, encapsulamento-vitrificação e a droplet-vitrification (GONZÁLEZ-BENITO; RAMÍREZ; ARANDA, 2004; XUE et al., 2008).

2.5 Criopreservação de sementes

Na criopreservação de sementes o teor de água é um fator crucial para o sucesso do armazenamento no nitrogênio líquido. Segundo Santos (2000), para se evitar injúria nas células, a água contida em seu interior deve ser removida evitando a formação de cristais de gelo durante o congelamento. A desidratação dos tecidos, no entanto, é crítica, pois a água tem muitas funções biológicas nas células. Segundo Kramer e Boyer (1995), com a retirada da água, aumentam-se a taxa de reações químicas destrutivas, como a cristalização dos solutos.

A desidratação, o congelamento, o descongelamento e a regeneração das sementes, são os principais fatores que influenciam a criopreservação e os três primeiros processos estão relacionados à formação de cristais de gelo no meio intracelular. Na regeneração, ocorre a recuperação do maior número possível de células vivas (SANTOS, 2000).

Durante o congelamento e descongelamento das sementes, a membrana plasmática exerce um papel primordial. Ela atua como uma barreira semipermeável permitindo o efluxo/influxo da água durante o processo de congelamento-descongelamento. Dessa forma, a estabilidade da membrana celular é um importante fator para o sucesso da criopreservação (UEMURA; STEPONKUS, 1994).

A criopreservação de sementes é uma poderosa ferramenta utilizada para a conservação de recursos genéticos vegetais. Observa-se que, para a criopreservação, o teor de água das sementes inteiras (ou eixos embrionários isolados), no momento da imersão em nitrogênio líquido, é o fator mais crítico (PENCE, 1995; STANWOOD, 1985). A água das sementes deve ser reduzida a um nível tal que a formação de gelo intracelular durante a etapa de congelamento seja minimizada, com isso, mantendo elevados níveis de capacidade de germinação (BLACK; PRITCHARD, 2002). Com base no nível

de tolerância à desidratação, as sementes são classificadas em três grandes grupos: ortodoxos, intermediárias e recalcitrantes. As sementes ortodoxas podem ser secas ao teor de água ultrabaixos (em geral inferior a 7%), sem perda grave de viabilidade (ROBERTS, 1973), enquanto as sementes intermediárias podem resistir à desidratação considerável, embora não ao nível das sementes ortodoxas (DUSSERT et al., 2004). As sementes recalcitrantes perdem a sua viabilidade, em virtude do dano ultraestrutural irreversível, mesmo quando seca a um limiar relativamente alto de teor de água (20-30%) (PRITCHARD, 2004).

2.6 Criopreservação de meristemas

Um método de criopreservação utilizando a vitrificação consiste em uma redução de temperatura de forma rápida. O objetivo de obter um sólido amorfo ou em estado vítreo, que difere do sólido cristalino, por não haver formação de cristais de gelo no interior dos compartimentos celulares (YAMAKI; PEDROSO; ATVARIS, 2002). Para a obtenção desse estado vítreo é necessário uma alta taxa de resfriamento (por exemplo, 2500 °C/ min) e a utilização de crioprotetores com alta viscosidade, também chamados de solução de vitrificação (CRUZAN et al., 2004).

Alguns cuidados são necessários para evitar a cristalização do gelo intracelular, durante o processo de congelamento, evitando, portanto, danos físicos ao tecido (PANIS; SWENNEN; ENGELMANN, 2001; SAKAI, 2000). A única maneira de evitar a formação de cristais de gelo a temperaturas ultrabaixas sem uma extrema redução do teor de água é a vitrificação, ou seja, não cristalização da água (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990). Para se obter uma solução vitrificada, esta tem de ser suficientemente concentrada e sofrer um resfriamento rápido (FAHY et al., 1984).

Usando culturas de meristema de banana como explante, dois protocolos de criopreservação foram desenvolvidos: um método simples de congelamento e um método de vitrificação que requer um pré-tratamento de sacarose. Estes dois métodos foram aplicados a uma vasta gama de variedades de banana que pertencem a diferentes grupos genômicos, e resultou em taxas diferentes de regeneração pós-descongelamento (PANIS et al., 2002; PANIS; THINH, 2001).

Em protocolos baseados em vitrificação, a desidratação do ápice caulinar é realizada utilizando soluções de vitrificação altamente concentradas. As soluções de vitrificação, apesar de seu papel útil para a criopreservação, apresentam toxicidade osmótica e química. Os procedimentos de desidratação/crioproteção precisam ser otimizados, principalmente quanto à escolha da solução de vitrificação utilizada e da duração do tratamento. Desta forma, é possível encontrar um equilíbrio entre a toxicidade e a ação de crioproteção dessas soluções (KIM et al., 2009; PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005).

No protocolo conhecido como “droplet-vitrification”, os ápices caulinares são osmoticamente desidratados em uma solução com alta concentração de açúcar, normalmente a sacarose, e depois com uma solução de vitrificação, como por exemplo, o PVS2. Após a crioproteção, os explantes são colocados sobre um pedaço de folha de alumínio juntamente com gotas de PVS2 e, então, mergulhados em nitrogênio líquido (SAKAI; ENGELMANN, 2007). Para o reaquecimento, as folhas de alumínio são imersas em meio líquido contendo 0,8-1,2 M de sacarose e, em seguida, as amostras são retiradas e colocadas sobre o meio de recuperação, que contém 0,3 M de sacarose no meio de cultura. A principal vantagem desta técnica é a possibilidade de atingir elevadas taxas de resfriamento/aquecimento, em razão do volume muito pequeno de solução de vitrificação em que os ápices são colocados, o que aumenta a probabilidade de obter um estado vitrificado durante o resfriamento e

para evitar a recristalização durante o reaquecimento (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005). Por conseguinte, a integridade estrutural de amostras criopreservadas é conservada, o que permite elevadas percentagens de recuperação e regeneração direta e rápida dos ápices criopreservados.

2.7 Criopreservação de calos

Apesar do valor de potencial, a manutenção em longo prazo de culturas de células é de trabalho intensivo e demorado, uma vez que requer subculturas periódicas. Isto pode ser evitado por criopreservação, que foi provado ser um método confiável e de baixo custo para armazenamento em longo prazo de germoplasma de plantas (KARTHA; ENGELMANN, 1994). Protocolos eficientes de criopreservação já foram realizados para culturas de células de plantas medicinais como ginseng (JOSHI; TENG, 2000), tabaco (REINHOUD; IREN; KIJNE, 2000), citros (HAO; YOU; DENG, 2002) e videira (WANG et al., 2004).

A criopreservação de tecidos não organizados (suspensões celulares e calos) normalmente visa à manutenção das características específicas de tecidos que podem ser perdidos durante a manutenção normal *in vitro*. Por exemplo, a criopreservação é importante para preservar a capacidade de biossíntese de compostos de valor de importância farmacêutica que são produzidos por células de plantas medicinais. O método que é muitas vezes utilizado para estes tecidos é o sistema de resfriamento lento (PANIS; LOMBARDI, 2005; URBANOVÁ; KOŠUTH; ČELLÁROVÁ, 2006).

O resfriamento lento é caracterizado, também, por uma desidratação celular gradual em face da formação de cristais de gelo no meio extracelular, permitindo o aumento da concentração de solutos no meio intracelular e,

portanto, evitando ou reduzindo a formação de cristais de gelo intracelular (SHAW et al., 2000). Para o resfriamento lento, o material biológico geralmente é congelado sob o controle de um freezer programável e, uma vez atingido uma adequada desidratação celular, a qual ocorre quando a temperatura se encontra entre -30 a -80 °C, o material é estocado em nitrogênio líquido à temperatura de -196 °C (PAYNTER, 2000).

Técnicas de criopreservação tradicionais utilizam equipamentos caros para efetuar um resfriamento gradual e congelamento dos explantes para evitar a formação de gelo intracelular, a qual é a causa principal de dano celular letal. Recentemente, novas abordagens para a criopreservação de tecidos vegetais por imersão direta em nitrogênio líquido foram exploradas e, destes, o procedimento de vitrificação provou ser o mais promissor (TSAI et al., 2009). O método de vitrificação não requer equipamento especial, é um procedimento rápido e com recuperação rápida dos explantes (ANJA; VELI-MATTI; JOACHIM-KELLER, 2011; ATTILA et al., 2008). Durante a última década, o método de vitrificação provou melhorar a regeneração de células criopreservadas (REED, 2001).

Poucos estudos examinaram a criopreservação de culturas de células não-embriogênicas por técnicas de vitrificação (WITHERS, 1985). Relata-se que células não-embriogênicas de cenoura e calos embriogênicos são diferentes na sua natureza morfológica e fisiológica (KIKUCHI, 1995); células embriogênicas são pequenas e compactas, enquanto que as células não-embriogênicas são maiores. Em geral, as grandes células são sensíveis à desidratação, células embriogênicas são pequenas e compactas, enquanto que as células não-embriogênicas são maiores (WITHERS, 1985). Na criopreservação de células vegetais, a desidratação antes da imersão em nitrogênio líquido é necessária para a sobrevivência das células após o seu armazenamento em nitrogênio líquido. Sugere-se que células não-embriogênicas podem ser mais sensíveis ao estresse da desidratação, e a criopreservação delas parece ser mais difícil. No entanto, a

criopreservação de células não-embriogênicas pode ser necessária para a conservação rotineira de linhagens celulares sem alterações genéticas.

2.8 Citometria de fluxo

A análise de citometria de fluxo de DNA vegetal tornou-se uma solução conveniente, confiável e prática. Este método de fácil manuseio foi utilizado com sucesso em diferentes estudos para detectar o nível de ploidia (RIVAL et al., 1997) e, mais recentemente, para avaliar a estabilidade de amostras sujeitas ao procedimento de criopreservação (HIRANO et al., 2005). As suspensões de núcleos intactos podem ser preparadas por corte de uma pequena quantidade de tecidos fresco no tampão de isolamento (GALBRAITH et al., 1983). Os núcleos suspensos são marcados com um fluorocromo de DNA específico, e o conteúdo de DNA é determinado pela medição da emissão de fluorescência (DOLEZEL; BARTOS, 2005).

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S. P. de et al. **Cerrado**: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464 p.
- ANJA, K.; VELI-MATTI, R.; JOACHIM-KELLER, E. R. Potato shoot tip cryopreservation: a review. **Potato Research**, Wageningen, v. 54, n. 1, p. 45-79, Mar. 2011.
- ATTILA, F. et al. Cryopreservation of wheat (*Triticum aestivum* L.) egg cells by vitrification. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 30, n. 5, p. 737-744, Sept. 2008.
- AUDI, E. A. et al. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. **Phytotherapy Research**, London, v. 13, n. 3, p. 264-266, May 1999.
- BARRADAS, M. M.; HANDRO, W. Algumas observações sobre a germinação da semente de barbatimão, *Stryphnodendron barbadetimam* (Vell.) Mart. (Leguminosae-Mimosoideade). **Boletim de Botânica**, São Paulo, v. 2, p. 139-150, 1974.
- BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. Glossary. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Ed.). **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Oxon: CABI, 2002. p. 373-382.
- CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Crioconservação no melhoramento vegetal**. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2003. 24 p. (Boletim Técnico - Documento, 115).
- CRUZAN, G. et al. Subchronic toxicity of ethylene glycol in Wistar and F-344 rats related to metabolism and clearance of metabolites. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 81, n. 2, p. 502-511, Oct. 2004.
- DOLEZ´EL, J.; BARTOS´, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 99-110, Jan. 2005.
- DUSSERT, S. et al. Inheritance of seed desiccation sensitivity in a coffee interspecific cross: evidence for polygenic determinism. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 402, p. 1541-1547, July 2004.

ENGELMANN, F.; ENGELS, J. M. M. Technologies and strategies for existing conservation. In: ENGELS, J. M. M. et al. (Ed.). **Managing plant genetic diversity**. Rome: CAB International, 2002. p. 89-104.

FAHY, G. M. et al. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, San Diego, v. 21, n. 4, p. 407-426, Aug. 1984.

FELFILI, J. M. et al. Estudo fenológico de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville no cerrado *sensu stricto* da Fazenda Água Limpa no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 83-90, abr. 1999.

FELIPE, A. M. M. et al. Antiviral effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on poliovirus and bovine herpesvirus. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 29, n. 6, p. 1092-1095, June 2006.

GALBRAITH, D. W. et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**, New York, v. 220, p. 1049-1051, 1983.

GILBERT, B.; FERREIRA, J. L. P.; ALVES, L. F. **Monografias de plantas medicinais brasileiras e aclimatadas**. Curitiba: Abifito, 2005. 250 p.

GONZÁLEZ-ARNAO, M. T. G. et al. Cryopreservation of encapsulated sugarcane apices: effect of storage-temperature and storage duration. **CryoLetters**, Cambridge, v. 20, n. 6, p. 347-352, Nov./Dec. 1999.

_____. 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.

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.

GOPI, C.; VATSALA, T. M. In vitro studies on effects of plant growth regulators on callus and suspension culture biomass yield from *Gymnema sylvestre*. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 5, n. 12, p. 1215-1219, June 2006.

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. G. de. Recursos medicinais de espécies do cerrado de matogrosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 17, n. 4, p. 561-584, 2003.

HAO, Y. J.; YOU, C. X.; DENG, X. X. Effects of cryopreservation on developmental competency, cytological and molecular stability of citrus callus. **Cryo-Letters**, Cambridge, v. 23, n. 1, p. 27-35, Jan./Feb. 2002.

HELLIOT, B. et al. 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.

HERZOG-SOARES, J. D. et al. Atividade tripanocida *in vivo* de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v. 12, n. 1, p. 1-2, 2002.

HIDEYUKI, Y. et al. Desiccation and cryopreservation of actively-growing cultured plant cells and protoplasts. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 97, n. 2, p. 151-158, May 2009.

HIRANO, T. et al. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, n. 8, p. 534-539, Jan. 2005.

HOLETZ, F. B. et al. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Manginhos, v. 100, n. 4, p. 397-401, 2005.

ISHIDA, I. et al. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 58, n. 5, p. 942-949, Nov. 2006.

JOSHI, A.; TENG, W. L. Cryopreservation of *Panax ginseng* cells. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 10, p. 971-977, Oct. 2000.

KARTHA, K. K.; ENGELMANN, F. Cryopreservation and germplasm storage. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. (Ed.). **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academy, 1994. p. 195-230.

KIKUCHI, A. et al. Differences in pectic polysaccharides between carrot embryogenic and non-embryogenic calli. **Plant cell Reports**, Berlin, v. 14, n. 5, p. 279-284, Feb. 1995.

KIM, H. H. et al. Development of alternative plant vitrification solutions in droplet-vitrification procedures. **Cryo-Letters**, Cambridge, v. 30, n. 5, p. 320-334, Sept./Oct. 2009.

KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. **Water relations of plants and soils**. San Diego: Academic, 1995. Disponível em: <<http://dspace.udel.edu:8080/dspace/handle/19716/2830>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

LACERDA, S. N. B. et al. Estudo comparativo da criopreservação de sementes de pau-ferro (*Caesalpinia ferrea* Mart.) com as técnicas convencionais de armazenagem. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 7-14, 2002.

LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; SOUZA JÚNIOR, P. T. de. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for anti-inflammatory activity. **Phytotherapy Research**, London, v. 12, n. 3, p. 212-220, May 1998.

LISHENG, K.; PATRICK, A. von. A novel method of cryopreservation without a cryoprotectant for immature somatic embryos of conifer. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 106, n. 1, p. 115-125, July 2011.

LOPES, G. C. et al. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 99, n. 2, p. 265-272, June 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. 384 p.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. de L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 892-896, set./out. 2005.

NICIOLI, P. M. et al. Ajuste do processo de micropropagação de barbatimão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 685-689, maio/jun. 2008.

PANIS, B. et al. Sucrose preculture to simplify cryopreservation of banana meristem cultures. **Cryo-letters**, Cambridge, v. 23, n. 6, p. 375-384, Nov./Dec. 2002.

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.

PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant Science**, Limerick, v. 168, n. 1, p. 45-55, Jan. 2005.

PANIS, B.; SWENNEN, R.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of plant germplasm. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 560, p. 79-86, 2001.

PANIS, B.; THINH, N. T. **Cryopreservation of Musa germplasm**. Montpellier: INIBAP, 2001. 48 p. (INIBAP Technical Guideline, 5).

PAYNTER, S. J. Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. **Human Reproduction**, Oxford, v. 6, n. 5, p. 449-456, Sept./Oct. 2000.

PENCE, V. C. Cryopreservation of recalcitrant seeds. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Cryopreservation of plant germplasm I**. Berlin: Springer Verlag, 1995. p. 29-50. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 32).

PEREIRA, A. V.; PEREIRA, E. B. C.; JUNQUEIRA, N. T. V. Propagação e domesticação de plantas nativas do cerrado com potencial econômico. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, 2001. Suplemento. 1 CD-ROM.

PETACCI, F. et al. Potencial fitotóxico de frutos de *Stryphnodendron polyphyllum*. **Revista Ecosistema**, Espírito Santo do Pinal, v. 26, n. 2, ago./dez. 2001. Disponível em:
<<http://ferramentas.unipinhal.edu.br/ojs/ecossistema/viewarticle.php?id=47>>.
Acesso em: 10 jul. 2012.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. Madrid: Mundi, 1990. 326 p.

PRITCHARD, H. W. Classification of seed storage 'types' for ex situ conservation in relation to temperature and moisture. In: GUERRANT, E. O.;

HAVENS, K.; MAUNDER, M. (Ed.). **Ex situ plant conservation**: supporting species survival in the wild. Washington: Island, 2004. p. 139-161.

REED, B. M. Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. **Cryo-Letters**, Cambridge, v. 22, n. 2, p. 97-104, Mar./Apr. 2001.

REINHOUD, P. J.; IREN, F. van; KIJNE, J. W. Physiological and molecular changes in tobacco suspension cells during development of tolerance to cryopreservation by vitrification. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm**: current research progress and application. Cambridge: Cambridge University, 2000. p. 57-66.

RIVAL, A. et al. Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) tissue cultures and seed derived plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, n. 12, p. 884-887, Dec. 1997.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, n. 3, p. 499-514, 1973.

SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry, cryopreservation of plant germplasm I**. New York: Springer, 1995. p. 53-69.

_____. Development of cryopreservation techniques. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm**: current research progress and application. Cambridge: Cambridge University, 2000. p. 1-7.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and dropletvitrification: a review. **CryoLetters**, Cambridge, v. 28, n. 3, p. 151-172, May/June 2007.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nuclear cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb var *Brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 9, p. 30-33, 1990.

SALAJ, T. et al. Regrowth of embryogenic tissues of *Pinus nigra* following cryopreservation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 106, n. 1, p. 55-61, July 2011.

SANTOS, I. R. I. Crioconservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, p. 70-84, 2000. Edição especial.

_____. Crioconservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 20, p. 60-65, maio/jun. 2001.

SANTOS, S. C. et al. Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 4, n. 16, p. 552-556, Oct./Dec. 2006.

SHAW, J. M. et al. Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. **Molecular and Cellular Endocrinology**, New York, v. 161, n. 1/2, p. 103-110, Mar. 2000.

SIMÕES, C. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 1999. 821 p.

SMITH, R. M. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. San Diego: Academic, 1992. 171 p.

SOUSA, C. M.; SILVA, R. L.; MIRANDA, R. M. Respostas morfológicas em vinca in vitro em função de balanços de fitoreguladores e níveis de sacarose. **Revista brasileira de Plantas medicinais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 9-14, 2007.

STANWOOD, P. C. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: KARTHA, K. K. (Ed.). **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton: CRC, 1985. p. 199-226.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. 182 p.

TSAI, S. F. et al. High-efficiency vitrification protocols for cryopreservation of in vitro grown shoot tips of transgenic papaya lines. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 98, n. 2, p. 157-164, Aug. 2009.

UEMURA, M.; STEPONKUS, P. L. A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance. **Plant Physiology**, New York, v. 104, n. 2, p. 479-496, Feb. 1994.

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.

VIETEZ, A. M.; SAN-JOSÉ, M. C. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants in vitro. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, Columbia, v. 32, n. 3, p. 140-147, 1996.

WANG, Q. et al. 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.

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.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. p. 297-330.

XUE, S. H. et al. 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.

YAMAKI, S. B.; PEDROSO, A. G.; ATVARS, T. D. Z. O estado vítreo dentro da perspectiva do curso de graduação em química: físico-química. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 330-334, mar./abr. 2002.

CAPÍTULO 2

Indução, determinação de fenóis totais e criopreservação de calos de barbatimão

RESUMO

O Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] é uma árvore com ocorrência predominante em cerrados dos estados brasileiros, sendo a sua casca rica em taninos que são utilizados na medicina popular em virtude de sua ação adstringente. Nos últimos anos, a exploração indiscriminada do barbatimão, fez com que essa planta medicinal sofresse queda na produção de sua casca. Objetivou-se neste estudo desenvolver calos de barbatimão a partir de segmentos cotiledonares e determinar o peso de matéria seca e fresca, teores de fenóis totais e a criopreservação dos calos induzidos. Para indução de calos foram utilizados segmentos cotiledonares inoculados em diferentes combinações de reguladores de crescimento: 2,4-D × TDZ (0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) e picloran × cinetina (0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹). As culturas foram incubadas no escuro. Aos 60 dias de subcultivo, foi avaliada a matéria fresca e seca e os teores de fenóis totais. Os melhores resultados obtidos para peso de matéria fresca de calos induzidos com a combinação (2,4-D e TDZ) foram: 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D, associado com as concentrações de 0,5, 1 e 2 mg L⁻¹ de TDZ, já para os valores de matéria seca a melhor combinação foi: 0,5 e 2 mg L⁻¹ de TDZ sem a presença do regulador de crescimento 2,4-D. Na combinação (Cinetina e Picloram) os melhores resultados para calogênese foram: 2 mg L⁻¹ de cinetina e 0,5 mg L⁻¹ de picloram, com média de 0,2 g para o peso da matéria fresca e 0,02 g para o peso da matéria seca. Pelos resultados observa-se que maiores teores de fenóis totais foram encontrados em calos induzidos em meios suplementados com 1 mg L⁻¹ de 2,4-D, e 2 mg L⁻¹ de cinetina e 1 mg L⁻¹ de picloram e pôde-se observar que o regulador de crescimento TDZ interferiu negativamente nos teores de fenóis totais quando combinado com o 2,4-D. Os calos de barbatimão não suportaram os tratamentos de crioproteção ao qual foram submetidos, e/ou ao armazenamento em nitrogênio líquido. Os ensaios realizados neste trabalho, onde foram utilizados diferentes reguladores de crescimento na indução de calos de barbatimão com o intuito de aumentar as concentrações de fenóis totais, não demonstraram resultados satisfatórios. Embora tenha se verificado baixa concentração de compostos fenólicos, é importante frisar que o meio de cultura pode ser otimizado para a produção em larga escala deste composto *in vitro*, já que na forma convencional esses compostos são extraídos a partir da casca da planta *in vivo*.

Palavras-chave: Crioprotetores; PVS2; reguladores de crescimento; fenóis.

ABSTRACT

Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville], is a tree with predominant occurrence in the Cerrado regions in the Brazilian States. Its bark is rich in tannins which is used in folk medicine due to its astringent function. In recent years, the indiscriminate exploitation of barbatimão tree led to a decrease in bark production of this medicinal plant. The aim of this study was to induce calluses from cotyledon segments and determine the weight of fresh and dry matter, the levels of phenols and also to cryopreserve the induced calluses. For callus induction, cotyledon segments were inoculated in a medium with different combinations of growth regulators: 2,4-D × TDZ (0, 0.5, 1.0 and 2.0 mg L⁻¹) and kinetin × picloran (0; 0.5, 1.0 and 2.0 mg L⁻¹). Cultures were incubated in the dark and at a temperature of 27 ± 2 ° C. At 60 days of subculture the fresh and dry weight and the levels of total phenols were evaluated. The best results obtained for the calluses fresh weight with the combination (2,4-D × TDZ) were: 0.5 mg L⁻¹ of 2,4-D associated with 0.5, 1.0 and 2.0 mg L⁻¹ concentrations of TDZ. For dry matter values the best combination was: 0.5 and 2.0 mg L⁻¹ TDZ in the absence of 2,4-D. For the (Kinetin × Picloram) combination, the best results for callus induction were: 2 mg L⁻¹ of kinetin and 0.5 mg L⁻¹ of Picloram, with an average of 0.2 g of fresh weight and 0.02 g of dry weight. The results indicated that higher levels of total phenols were found in calluses induced on a medium supplemented with 1.0 mg L⁻¹ of 2,4-D, 2.0 mg L⁻¹ of kinetin and 1.0 mg L⁻¹ of Picloram. A negative effect for TDZ regarding the total phenol levels when combined with 2,4-D was noted. Barbatimão calluses did not supported cryoprotection treatments to which they were submitted, and / or storage in liquid nitrogen. The tests performed in this study, where different growth regulators were used for barbatimão callus induction in order to increase phenol concentrations, did not present satisfactory results. Although a low concentration of phenolic compounds was obtained, it is important to note that the culture medium may be optimized for large scale *in vitro* production of this compound.

Keywords: Cryoprotectants; PVS2; growth regulators; phenols

1 INTRODUÇÃO

A técnica de cultura de tecidos vegetais permite a indução e proliferação de massas indiferenciadas de células conhecidas como calos ou suspensões celulares (PAZ et al., 2006). As culturas *in vitro* são utilizadas como uma alternativa aos processos agrícolas para a produção de compostos medicinais interessantes. Neste contexto, os calos podem ser armazenados em longo prazo de modo a manter as características específicas dos tecidos que podem ser perdidos durante a manutenção normal *in vitro*, tais como a produção de metabólitos secundários que têm importância farmacêutica (ESTRADA-ZÚÑIGA et al., 2009; KIM; WYSLOUZIL; WEATHERS, 2002). A cultura de calo é uma ferramenta fundamental não apenas para estabelecer um protocolo eficiente para a produção de metabólitos secundários valiosos, mas também para estudar os parâmetros de crescimento celular (KHIET et al., 2006).

Muitas plantas medicinais nativas do Brasil estão ameaçadas, principalmente porque elas são usadas como extratos ou infusões pela população e o barbatimão [*Sthyphnodendron adstringens* (Mart.) coville] está entre essas espécies, pois da planta pode ser extraído cerca de 20 a 30% de taninos (LIMA; MARTINS; SOUZA JÚNIOR, 1998). Uma forma de diminuir este problema é utilizar a cultura de tecidos vegetais, que proporcionam um procedimento de extração alternativo a partir de células, tecidos e órgãos de plantas de forma asséptica, controlável e automatizado, resultando em cultivos em larga escala. Neste contexto, as culturas de calos representam um dos melhores sistemas para a produção de metabólitos secundários, porque pode garantir a homogeneidade da produção e, também, o crescimento rápido (ESTRADA-ZÚÑIGA et al., 2009).

A criopreservação é uma alternativa para a conservação de calos em longo prazo. O armazenamento a -196°C em nitrogênio líquido é considerado

uma ferramenta ideal para a conservação em longo prazo, garantindo a estabilidade máxima do comportamento fenotípico e genotípico de germoplasmas armazenados, além de necessitar de um espaço mínimo de armazenamento e de requisitos de manutenção (SUZUKI et al., 2008). No entanto, a disponibilidade ou o desenvolvimento de protocolos eficientes e confiáveis que permita uma alta porcentagem de viabilidade do material criopreservado após o descongelamento é um requisito básico.

Neste contexto, objetivou-se neste trabalho induzir calos com potencial para a produção de compostos fenólicos e estabelecer uma metodologia de criopreservação deste material.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Os frutos de *S. adstringen* foram colhidos maduros, ainda fechados, de plantas de populações naturais localizadas na cidade de Ijací, região Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. Posteriormente as sementes foram extraídas manualmente dos frutos e aquelas que apresentavam boa integridade física foram selecionadas. Em seguida, as sementes foram transferidas para frascos de vidro e armazenadas em geladeira, a 4 °C, por 30 dias.

Antes da inoculação, as sementes foram submetidas à escarificação ácida, ficando imersas por 60 minutos em ácido sulfúrico 36N, 95 %, seguidas de lavagem em água corrente (MARTINS; NAKAGAWA, 2008). Depois, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram imersas em álcool etílico 70 % (v/v) por um minuto e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio 2 % por cinco minutos e lavadas em água destilada autoclavada por três vezes. Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescidos com 10 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar. Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância de fótons de 36 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2 °C. Após 30 dias de cultivo, as folhas cotiledonares foram utilizadas como fonte de explantes.

2.2 Indução de calogênese

No experimento I, segmentos de folhas cotiledonares de tamanho de

0,25 cm², obtidos de plântulas germinadas *in vitro*, foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio de cultura MS suplementado com 0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de ácido 2,4 -diclorofenoxiacético (2,4-D) e 0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de Thidiazuron (TDZ), em todas as combinações possíveis e 3% de sacarose. O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e o pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos. As culturas foram incubadas no escuro e em temperatura de 27 ± 2°C. O subcultivo dos calos foi realizado após 60 dias da primeira inoculação.

No experimento II, segmentos de folhas cotiledonares obtidas da mesma origem do experimento I foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio de cultura MS suplementado com 0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de picloran e 0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de cinetina, em todas as combinações possíveis e 3% de sacarose. O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e o pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos. As culturas foram incubadas no escuro e em temperatura de 27 ± 2°C. O subcultivo dos calos foi realizado após 60 dias a inoculação.

Após 120 dias de cultivo dos calos de barbatimão, avaliaram-se o peso da matéria fresca e seca e os teores de fenóis totais.

2.3 Determinação de fenóis totais

As análises foram realizadas no Laboratório de Farmacobotânica e Farmacognosia, Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Alfenas. A determinação do teor de fenóis totais presentes nas amostras de extrato etanólico dos calos foi realizada por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999). O extrato etanólico (100 mg) foi dissolvido em metanol, transferido quantitativamente para um

balão volumétrico de 100 mL e o volume final foi completado com metanol. Uma alíquota de 7,5 mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL; esta segunda solução teve seu volume acertado novamente com metanol. Uma alíquota de 100 μ L desta última solução foi agitada com 500 μ L do reagente de Folin- Ciocalteu e 6 mL de água destilada por 1 min; passado este tempo 2 mL de Na_2CO_3 a 15% foram adicionados à mistura e agitada por 30 s. Finalmente, a solução teve seu volume acertado para 10 mL com água destilada. Após 2 h, a absorvância das amostras foi medida a 750 nm utilizando-se cubetas de vidro, tendo como “branco” o metanol e todos os reagentes, menos o extrato. O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (10 a 350 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.4 Curva de crescimento de calos

Calos formados em meio de cultura suplementado com 1 mg L^{-1} de 2,4-D, no primeiro experimento, e com 2 mg L^{-1} de cinetina e 1 mg L^{-1} de picloram, no segundo experimento, apresentaram maiores concentrações de fenóis totais, mas a técnica de criopreservação sugere que os calos devem ter aspectos friáveis, se não embriogênicos. Diante deste fato, foram utilizados calos provenientes da concentração de 1 mg L^{-1} de 2,4-D, por apresentar aspecto mais semelhante ao friável, do que os calos do outro tratamento (Figura 1).

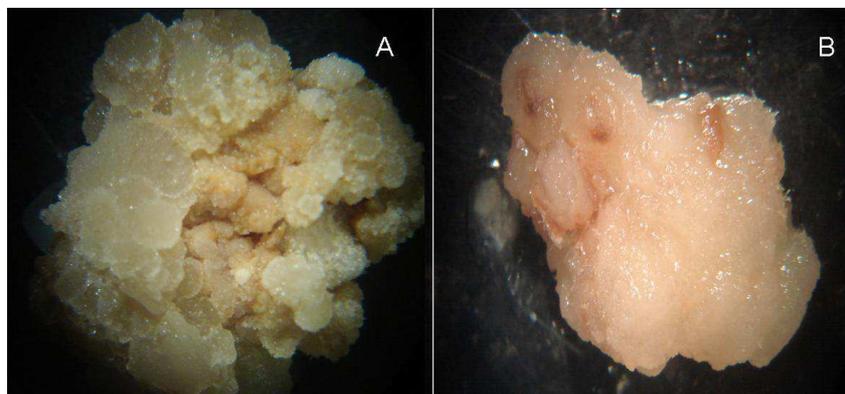


Figura 1 Aspecto dos calos induzidos em meio suplementado com 1 mg L^{-1} de 2,4-D (A) e com 2 mg L^{-1} de cinetina e 1 mg L^{-1} de picloram (B).

Plântulas obtidas de germinação *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes. Segmentos de folhas cotiledonares, de aproximadamente $0,25 \text{ cm}^2$, foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio MS, 3% de sacarose, 0,7% de ágar e, com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. Os explantes ficaram em sala de crescimento, encubados na ausência de luz à temperatura de $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Para a determinação da curva de crescimento dos calos foram realizadas pesagens da massa fresca do material inoculado a partir do dia da inoculação (tempo 0) até o 63º dia de cultivo, em intervalos de 7 dias. Foram utilizadas 12 repetições, sendo cada repetição constituída por um tubo e cada tubo contendo um explante.

2.5 Criopreservação de calos

Calos induzidos de segmentos de folhas cotiledonares utilizando 1 mg L^{-1} de 2,4-D provenientes dos experimentos realizados anteriormente neste trabalho, foram utilizados como material a serem criopreservados. Os explantes iniciais continham $0,5 \text{ cm}$ aproximadamente.

No experimento I, foi realizado um pré-cultivo de calos, transferindo-os para placas de petri contendo meio de indução (1 mg L^{-1} de 2,4-D) acrescentado com 6% de manitol durante cinco dias, na ausência de luz e a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Posteriormente, os calos foram transferidos para criotubos contendo meio de indução com 0,4 M de sacarose, sem a adição de ágar, e concentrações diferentes de DMSO 5%, 7,5% e 10% por 15, 30 ou 45 minutos. Em seguida, os criotubos foram armazenados em nitrogênio líquido por uma hora.

No experimento II, foi realizado um pré-cultivo de calos, transferindo-os para placas de petri contendo meio de indução (1 mg L^{-1} de 2,4-D) acrescentado com 6% de manitol durante cinco dias, na ausência de luz e a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Posteriormente, os calos foram transferidos para criotubos contendo meio de indução adicionando 0,4 M de sacarose e, em seguida, foi adicionada uma solução contendo 2,0 M de glicerol por um período de uma hora à temperatura ambiente. A solução crioprotetora foi substituída novamente por uma solução resfriada (0°C) e permaneceram neste meio por 15, 30 ou 45 minutos. Em seguida, os criotubos foram armazenados em nitrogênio líquido por uma hora.

No experimento III, foi realizado um pré-cultivo de calos, transferindo-os para placas de petri contendo meio de indução (1 mg L^{-1} de 2,4-D) acrescentado com 6% de manitol durante cinco dias, na ausência de luz e a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Foi testada a solução de vitrificação PVS2 (30% glicerol + 15% etileno glicol + 15% dimetil sulfoxido (DMSO) + meio MS líquido contendo 0,4 M de sacarose (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1991) ou PVS2 modificada (40% glicerol + 0,4 M sacarose + 10% etileno glicol + 10% DMSO) previamente resfriadas (0°C), e pH ajustado para 5,8. A incubação foi em gelo por 15, 30 ou 45 minutos. Em seguida, os criotubos foram armazenados em nitrogênio líquido por uma hora.

No experimento IV, calos foram precultivados em meio de indução com 120 g L^{-1} de sacarose por cinco dias. Após esse período os calos foram dispostos

em papéis filtro autoclavados e foram dessecados pelo fluxo de ar da câmara de fluxo pelos períodos de 15, 30, 45 e 60 minutos. Em seguida, os calos foram colocados em criotubos, e estes em um recipiente plástico de resfriamento com álcool metílico, e resfriados até a -40°C em um ultrafreezer. Após este período, os criotubos foram imersos em nitrogênio líquido por uma hora.

No experimento V, calos foram precultivados em meio de indução com 120 g L^{-1} de sacarose por cinco dias. Os calos foram imersos em PVS2 a 0°C pelos períodos de 15, 30, 45 e 60 minutos. Em seguida, os calos foram colocados em criotubos, e estes em um recipiente plástico de resfriamento com álcool metílico, e resfriados até a -40°C em um ultrafreezer. Após este período, os criotubos foram imersos em nitrogênio líquido por uma hora.

Na etapa de descongelamento, os criotubos foram aquecidos em banho-maria a $38\pm 2^{\circ}\text{C}$, sob agitação, até o descongelamento total da solução. Retiraram-se os calos das soluções crioprotetoras e inoculou-se em meio de cultura de indução de calos sem a presença de ágar, por 15 minutos. Depois os calos foram transferidos para placas de petri contendo meio de indução de calos. Após 60 dias avaliou-se o crescimento da área dos calos.

O experimento foi conduzido seguindo um delineamento inteiramente casualizado, constituído de dez repetições por tratamento. Os dados foram submetidos ao software SISVAR (FERREIRA, 2011), para a realização das análises de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Indução de calogênese

No experimento I, na ausência de reguladores de crescimento (controle) não foi observado calogênese em explantes cotiledonares. Os meios com ausência e suplementado com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, associado com as concentrações de $0,5$, 1 e 2 mg L^{-1} de TDZ induziram a formação de calos com maiores valores para o peso da matéria fresca, juntamente com os meios contendo 1 mg L^{-1} de 2,4-D associado com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de TDZ e 2 mg L^{-1} de 2,4-D associado com 1 mg L^{-1} de TDZ (Figura 1).

Para os valores do peso de massa seca observou-se comportamento diferente entre os tratamentos. Os maiores valores foram obtidos nas concentrações de $0,5$ e 2 mg L^{-1} de TDZ sem a presença do regulador de crescimento 2,4-D. Observou-se que os calos induzidos somente com 2,4-D obtiveram os menores valores de massa seca. Na combinação de 2,4-D com o TDZ também observou queda na massa seca dos calos, principalmente com o aumento das concentrações da auxina (Figura 1).

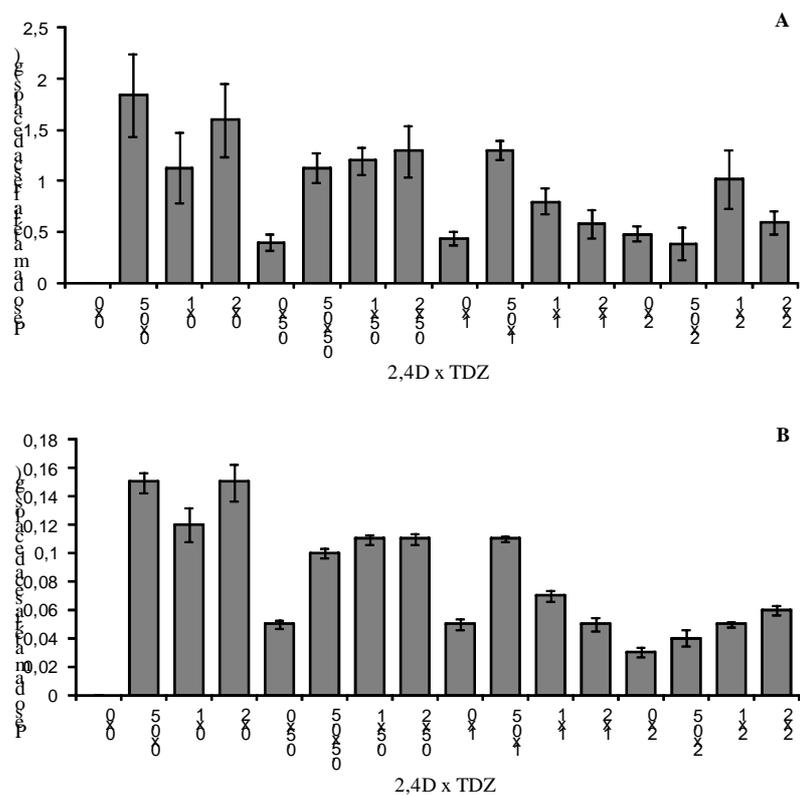


Figura 1 Médias do peso da matéria fresca (A) e seca (B) de calos de barbatimão induzidos de folhas cotiledonares utilizando a combinação de diferentes concentrações de 2,4-D e TDZ.

Castro et al. (2009) observaram baixos valores de matéria fresca de calos induzidos no escuro a partir de segmentos foliares de *S. adstringens* utilizando diferentes concentrações de 2,4-D. Em murici-pequeno (*Byrsonima intermedia*), a interação de 1 mg L⁻¹ de 2,4-D com as concentrações de 0,5, 1 e 2 mg L⁻¹ de TDZ levou a uma queda na indução de calos em segmentos foliares, quando houve o aumento na concentração de TDZ (NOGUEIRA et al., 2007). Os resultados obtidos e citados neste trabalho demonstram que a indução de calos é influenciada pelo balanço hormonal entre auxina e citocinina.

Para o experimento II, na figura 2 observou-se que, ao utilizar somente cinetina ou picloram, independente das suas concentrações, não houve formação de calos nos explantes, assim como os segmentos inoculados sem a presença de nenhum dos dois reguladores de crescimento, diferindo estatisticamente de todos os outros tratamentos. Os maiores valores foram observados no tratamento contendo 2 mg L⁻¹ de cinetina e 0,5, 1 e 2 mg L⁻¹ de picloram, com média de 0,2 g para o peso da matéria fresca e 2 mg L⁻¹ de cinetina e 0,5, e 2 mg L⁻¹ de picloram 0,02 g para o peso da matéria seca. Pode-se observar um incremento na calogênese com o aumento da concentração de cinetina, mas em contra partida, foi menor a formação de calos quando a concentração de picloram foi elevada.

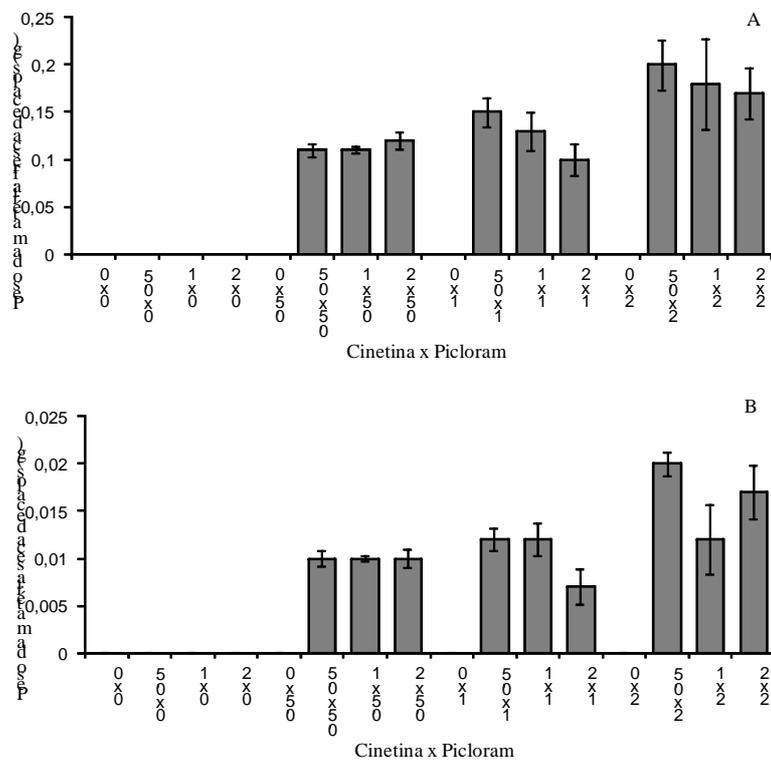


Figura 2 Médias do peso da matéria fresca (A) e seca (B) de calos de barbatimão induzidos de folhas cotiledonares utilizando a combinação de diferentes concentrações de cinetina e picloram.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com Damiano Filho (1995), pois esse autor afirma que dentre as espécies lenhosas, a maioria requer altas concentrações, acima de 1 mg L^{-1} , de reguladores de crescimento no meio de cultura para induzir a formação de calos em seus explantes.

Nicoli et al. (2010) observaram resultados similares ao encontrarem maiores valores de matéria fresca para calos induzidos a partir de segmentos nodais submetidos à combinação de $0,5$ ou 1 mg L^{-1} de picloram com $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de cinetina, mas também a $0,5$ ou 2 mg L^{-1} de picloram.

Os resultados neste trabalho mostraram que segmentos de folhas cotiledonares de barbatimão precisaram da interação de cinetina e picloram para que ocorresse a calogênese. Essa influência positiva da interação entre cinetina e picloram também foi verificada em experimentos envolvendo calogênese de *Rudgea jasminoides*, onde a concentração de $0,48 \text{ mg L}^{-1}$ para ambos os fitorreguladores foi o necessário para o aumento da ocorrência de calos (STELLA; BRAGA, 2002). Kaur e Kothari (2004) também testaram a influência do picloram e cinetina na indução de calos de *Paspalum scrobiculatum*, e observaram que a interação entre esses dois reguladores demonstraram maiores pesos da matéria fresca dos calos.

As auxinas são responsáveis pelo início da divisão celular e pelo controle dos processos de crescimento e alongamento celular, sendo indispensáveis para a formação de calos (TAIZ; ZEIGER, 2009). Já as citocininas também são necessárias para a divisão celular das plantas com resultados positivos na indução de calo (PASQUAL, 2001), confirmando que a calogênese observada neste experimento provavelmente foi favorecida pela ação conjunta desses fitorreguladores.

3.2 Determinação de fenóis totais

No experimento I, as análises demonstraram que todos os calos continham a presença de fenóis totais, independente da concentração ou combinação dos reguladores de crescimento testados. Maiores teores de fenóis totais foram encontrados em calos induzidos em meios suplementados com 1 mg L⁻¹ de 2,4-D. Ao comparar os valores do teor de fenóis com o peso da matéria seca dos calos, observou-se que os calos induzidos a partir das concentrações de 1 e 2 mg L⁻¹ tiveram baixos valores de matéria seca e altos valores no teor de fenóis, em relação aos outros tratamentos (Figura 3).

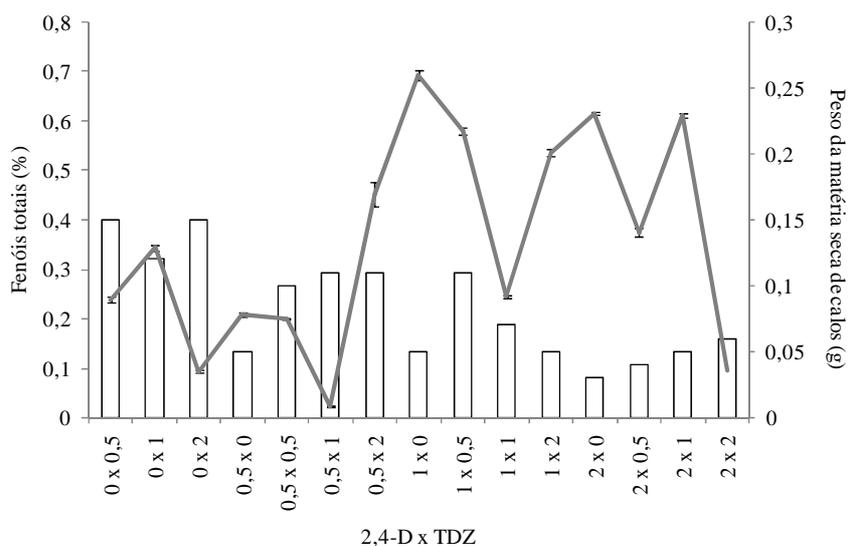


Figura 3 Médias do peso da matéria seca e de fenóis totais de calos de barbatimão induzidos de folhas cotiledonares utilizando a combinação de diferentes concentrações de 2,4-D e TDZ.

Este ensaio mostrou que os calos formados a partir de folhas cotiledonares utilizando no meio de cultura diferentes concentrações de 2,4-D e

TDZ, continham diferentes teores de fenóis. Castro et al. (2009), ao induzir a calogênese em segmentos foliares, utilizando diferentes concentrações de 2,4-D, observaram a presença de fenóis totais. Os autores também observaram que o aumento da concentração de 2,4-D resultou em maior peso de matéria seca e também ao aumento nos teores de fenóis totais. Neste trabalho a interação de 2,4-D com TDZ proporcionaram maiores pesos de matéria seca dos calos, mas teores menores de fenóis. Isso mostra que o regulador de crescimento TDZ interferiu negativamente nos teores de fenóis totais, não demonstrando ser um bom regulador de crescimento para esse fim nesta espécie.

Para o experimento II, a Figura 4 mostra que, para todos os tratamentos que induziram calos, houve a presença de fenóis totais. Os maiores teores de fenóis foram encontrados nos calos induzidos em meios de cultura contendo 2 mg L⁻¹ de cinetina e 1 mg L⁻¹ de picloram.

Na comparação entre os teores de fenóis totais com o peso da matéria seca dos calos observaram-se que calos induzidos nas concentrações de 0,5 e 1 mg L⁻¹ de cinetina quando combinados com 0,5, 1 ou 2 mg L⁻¹ de picloram apresentaram um incremento nos teores de fenóis totais, de acordo com o aumento da concentração do picloram. Entretanto, na concentração de 2 mg L⁻¹ de cinetina combinado com 1 mg L⁻¹ de picloram proporcionou maiores teores de fenóis totais em relação aos calos induzidos com 2 mg L⁻¹ de cinetina combinado com 0,5 ou 2 mg L⁻¹ de picloram. Verificou-se, também, que os calos com peso de matéria seca similares ou menores que os demais tratamentos, apresentavam maiores incrementos de fenóis totais.

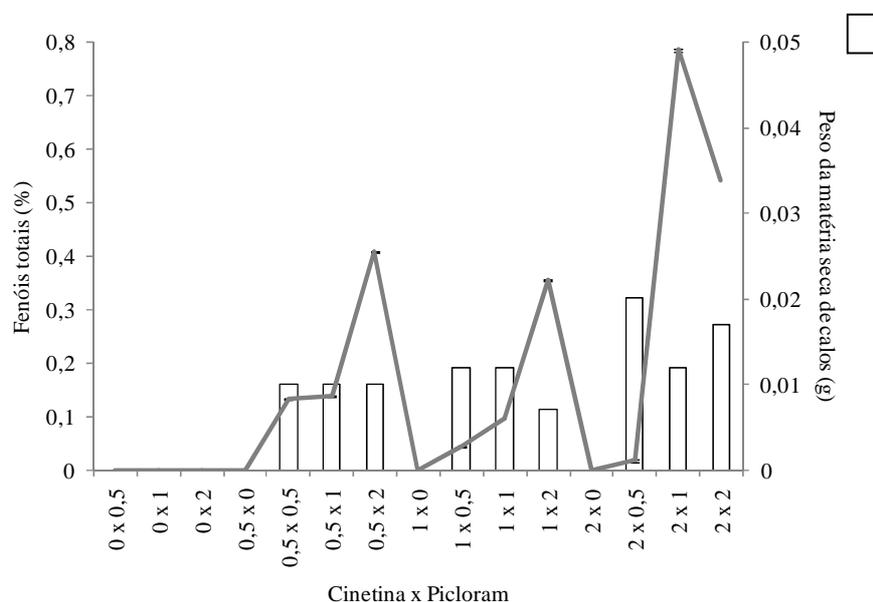


Figura 4 Médias do peso da matéria seca e de fenóis totais de calos de barbatimão induzidos de folhas cotiledonares utilizando a combinação de diferentes concentrações de cinetina e picloram.

Neste experimento observou-se que o picloram foi imprescindível para o aumento nos teores de fenóis quando combinados com a cinetina, em calos induzidos de folhas cotiledonares de barbatimão. Nicioli et al. (2010), ao induzir calogênese a partir de segmentos nodais de barbatimão, utilizando diferentes concentrações de cinetina e picloram isolados ou combinados no meio de cultura, verificaram que a concentração de 1 mg L^{-1} de cinetina promoveu maiores teores de fenóis totais, em relação a combinação dos dois reguladores de crescimento e do picloram isoladamente.

A combinação entre o peso da matéria seca dos calos e a concentração de fenóis totais, neste ensaio, corroboram com o trabalho de Nicioli et al. (2010), pois os autores também encontraram maiores concentrações de fenóis totais em calos com menores pesos.

Os ensaios realizados neste trabalho, utilizando diferentes reguladores de crescimento na indução de calos de barbatimão com o intuito de aumentar as concentrações de fenóis totais, não demonstraram resultados satisfatórios, pois um estudo com barbatimão verificou as concentrações de compostos fenólicos totais, e revelaram 13,96%, 11,47% e 2,35%, para as amostras de folha, casca, e caule, respectivamente (MACEDO et al., 2007). Apesar de o experimento ter obtido baixa concentração de compostos fenólicos, é importante frisar que o meio de cultura pode ser otimizado para a produção em larga escala deste composto, uma vez que foi obtido *in vitro*, e na forma convencional, é extraído a partir da casca da planta *in vivo*.

3.3 Curva de crescimento de calos

O crescimento dos calos seguiu uma curva do tipo sigmoide, com cinco fases distintas: lag, log, linear, desaceleração e estacionária (Figura 5).

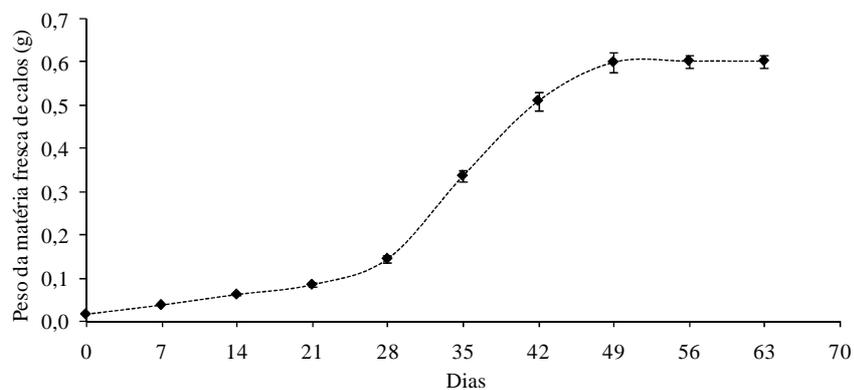


Figura 5 Curva de crescimento de calos formados a partir de segmentos de folhas cotiledonares de barbatimão, inoculados em meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D durante 63 dias de cultivo.

A fase lag, na qual as células se preparam para a divisão, ocorreu até o 21º dia após a inoculação, apresentando 81% de crescimento. A segunda fase, a log, ou de crescimento exponencial estendeu-se do 21º ao 28º dia de cultivo, com 41% de crescimento. A fase lag pode ser considerada como uma fase produtora de energia e a fase exponencial como a fase biossintética (SHIMIZU et al., 1977). A fase linear, com 71% de crescimento, foi observada entre o 28º e o 42º dia de cultivo. Segundo Serra, Paiva e Paiva (2000), nesse período, a divisão celular diminui e as células crescem. Entre o 42º e o 49º dia após a inoculação ocorreu a fase de desaceleração, apresentando 14% de crescimento. O início dessa fase é a ideal para a repicagem dos calos. As culturas devem ser transferidas para um novo meio de cultura, em virtude da redução de nutrientes, secagem do ágar e acúmulo de substâncias tóxicas (SMITH, 1992). Do 49º ao 63º dia de incubação, caracterizou-se a fase de estabilização, onde há um maior número de células com menor capacidade de divisão.

Nogueira et al. (2007), ao analisarem a curva de crescimento de calos de explantes foliares de murici-pequeno induzidos em meio MS suplementado, também, com 1 mg L⁻¹ de 2,4-D, verificaram que o crescimento dos calos seguiu curva do tipo sigmoidal, assim como neste trabalho, mas os autores sugeriram que o período para a repicagem do material deve ser entre o 60º e o 80º dia após a inoculação. E neste trabalho, o período de desaceleração do crescimento dos calos de barbatimão ocorreu entre 42º e o 49º dia após a inoculação, sendo este o melhor momento para a repicagem do material.

O comportamento sigmoidal na curva de crescimento de calos de ingazeiro também foi verificado por Stein et al. (2010), quando segmentos foliares foram inoculados em meio de cultura com 2,4-D. Pôde-se constatar que a fase estacionária iniciou-se a partir do 70º.

3.4 Criopreservação de calos

Os calos criopreservados não apresentaram crescimento em suas áreas após 60 dias de cultivo, nos experimentos I, II, III, IV e V de criopreservação executados neste trabalho (Figura 6). Pode-se observar que o tamanho dos calos criopreservados em relação a calos que não passaram pelos processos de criopreservação não cresceram. Todos os explantes mantiveram o mesmo tamanho (0,5 cm aproximadamente) que os explantes iniciais.

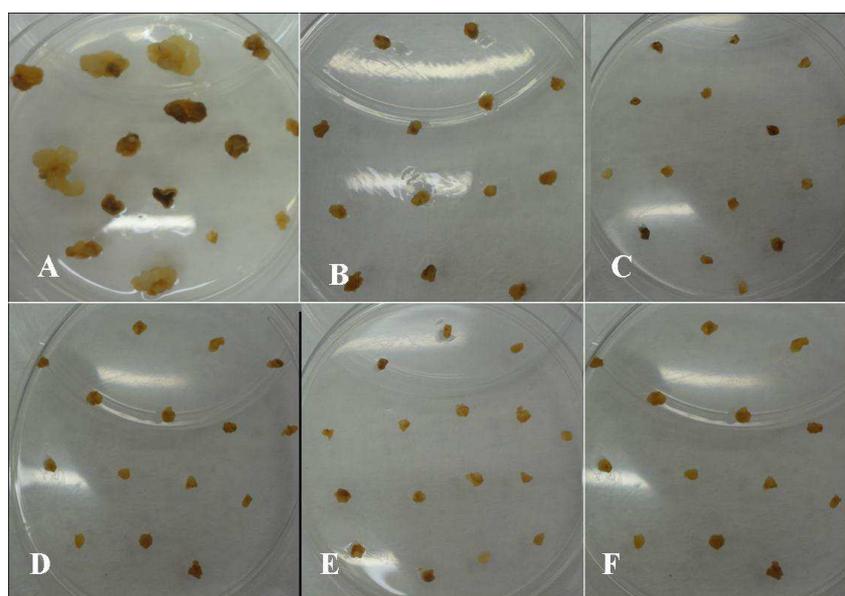


Figura 6 Aspecto visual dos calos de barbatimão submetidos à criopreservação. Calos formados sem o processo de criopreservação (A), calos criopreservados no experimento I (B), II (C), III (D), IV (E) e V (F).

Determinou-se neste trabalho que os calos de barbatimão não suportaram os tratamentos de crioproteção ao qual foram submetidos, e/ou ao armazenamento em nitrogênio líquido.

Sendo considerada uma fase crítica, o insucesso na criopreservação causada por danos nos tecidos possivelmente pode estar relacionado à fase de desidratação, ou seja, antes mesmo da exposição dos explantes ao nitrogênio líquido.

O manitol remove o excesso de água intracelular por meio do gradiente osmótico fazendo com que o crescimento da cultura ocorra mais lentamente (DUMET et al., 1993). Esse fato pode explicar o efeito altamente estressante do manitol sobre as culturas. O manitol apresenta um efeito retardante no crescimento e desenvolvimento de um grande número de espécies e é utilizado com bastante frequência na conservação *in vitro*. Normalmente, este carboidrato é adicionado ao meio para redução do seu potencial hídrico, impedindo a absorção de sais e nutrientes do meio (LEDO; CUNHA; ARAGÃO, 2007).

Os crioprotetores (DMSO, etileno glicol, glicerol entre outros) são compostos químicos utilizados para proteção do material biológico, porém podem ser responsáveis pela baixa viabilidade e menor taxa de regeneração após período de armazenamento (VERLEYSEN et al., 2004).

Os crioprotetores podem ser tóxicos ou podem causar estresse osmótico, levando à morte as células ou modificando sua resposta morfogênética em cultura (SAKAI, 1995; SANTOS, 2001). Matsumoto et al. (2004) avaliaram os efeitos de crioprotetores na criopreservação de calos embriogênicos de *Dimocarpus longan* e constataram que a mistura de 5% de glicerol + 5% de DMSO proporcionou a maior quantidade de matéria fresca dos calos, enquanto a solução de vitrificação PVS2 foi tóxica para os calos dessa espécie.

A conservação de germoplasma pelo congelamento mantém as características do material e suas alterações são menores do que qualquer outro método convencional. Mesmo assim, nem sempre é possível manter uma integridade celular, pois a água congelada tem um comportamento peculiar: expande-se ao cristalizar e, ao fundir-se, tem a tendência de recristalizar

formando longos e protudentes cristais de gelo (CARNEIRO; CAL-VIDAL, 2000). Esses cristais geram uma série de danos mecânicos, bioquímicos e osmóticos aos tecidos (CARVALHO, 2007).

Mesmo assim, a criopreservação baseada na técnica de vitrificação já se mostrou eficiente para calos embriogênicos de diferentes espécies (CHENSHU et al., 2003; MATSUMOTO et al., 2004; SUDARMONOWATI, 2001).

4 CONCLUSÕES

Conclui-se que a combinação de diferentes concentrações de auxinas e citoninas estudadas promovem a formação de calos em folhas cotiledonares de barbatimão. Que as maiores concentrações de fenóis totais são encontrados em calos formados apenas com a utilização de 1 mg L^{-1} de 2,4-D ou a combinação de 2 mg L^{-1} de cinetina e 1 mg L^{-1} de picloram no meio de cultura.

A repicagem dos calos induzidos com 1 mg L^{-1} de 2,4-D devem ser realizados no 49º dia de cultivo.

Os calos de barbatimão não sobreviveram aos diferentes testes de vitrificação e armazenamento em nitrogênio líquido.

REFERÊNCIAS

- CARNEIRO, C. S.; CAL-VIDAL, J. Estruturação de cristais de gelo em soluções aquosas contendo solutos diversos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 2, p. 423-432, fev. 2000.
- CARVALHO, F. de. Indução de estruturações esféricas ou similares durante a cristalização da água por processos físicos ou químicos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 814-820, maio/jun. 2007.
- CASTRO, A. H. F. et al. Calogênese e teores de fenóis e tatinos totais em barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (mart.) coville]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 385-390, mar./abr. 2009.
- CHENSHU, A. et al. Optimization of cryopreservation of *Artemisia annua* L. callus. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 25, n. 1, p. 35-38, Jan. 2003.
- DAMIÃO FILHO, C. F. **Cultura de tecidos de plantas: micropropagação**. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 25 p.
- DUMET, D. et al. Importance of source for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryoletters**, London, v. 14, n. 1, p. 243-250, Jan./Feb. 1993.
- ESTRADA-ZÚÑIGA, M. E. et al. Phenylpropanoid production in callus and cell suspension cultures of *Buddleja cordata* Kunth. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 97, n. 1, p. 39-47, Apr. 2009.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.
- KAUR, P.; KOTHARI, S. L. In vitro culture of kodo millet: influence of 2,4-D and picloran in combination with kinetin on callus initiation and regeneration. **Plant Cell and Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 77, n. 1, p. 73-79, 2004.
- KHIET, B. L. T. et al. Primary study of cell suspension culture of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* F. *flavicarpa*). In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON BIOTECHNOLOGY IN AGRICULTURE, 1., 2006, Ho Chi Minh. **Proceedings...** Ho Chi Minh: Nong Lam University, 2006. p. 113-114.

KIM, Y.; WYSLOUZIL, B. E.; WEATHERS, P. J. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 38, n. 1, p. 1-10, Jan. 2002.

LEDO, A. da S.; CUNHA, A. O.; ARAGÃO, W. M. Efeito da sacarose e do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento de coqueiro-anão. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 19, n. 4, p. 346-351, out./dez. 2007.

LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; SOUZA JÚNIOR, P. T. de. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for anti-inflammatory activity. **Phytotherapy Research**, London, v. 12, n. 3, p. 212-220, May 1998.

MACEDO, F. M.; TAVARES, G. M.; MENDES, C. S. O.; SILVA, C. M.; RODRIGUES, C. G.; OLIVEIRA, D. A. Determinação de Compostos Fenólicos Totais em Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville]. **Revista Brasileira de Biociências** (Impresso), Porto Alegre, v. 5, p. 1164-1165, 2007.

MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J. Germination of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville seeds from different sources submitted to dormancy breaking treatments. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 32, n. 6, p. 1059-1067, nov./dez. 2008.

MATSUMOTO, K. et al. Criopreservação e embriogênese somática de calos de *Dimocarpus longan*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 12, p. 1261-1263, dez. 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, Mar. 1962.

NICIOLI, P. M. et al. Induction and phytochemical analyses in *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville Calli. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 5, n. 2, p. 159-162, abr./jun. 2010.

NOGUEIRA, R. C. et al. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, mar./abr. 2007.

PASQUAL, M. **Meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127 p. (Textos Acadêmicos).

PAZ, A. R. et al. Callus and suspension culture induction, maintenance, and characterization. In: VARGAS, V. M. L.; FLOTA, F. V. (Ed.). **Plant cell culture protocols**. 2nd ed. Totowa: Humana, 2006. p. 59-70.

SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry, cryopreservation of plant germplasm I**. New York: Springer-Verlag, 1995. p. 53-69.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) by a simple freezing method. **Plant Science**, Limerick, v. 74, n. 2, p. 243-248, Feb. 1991.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biociência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 20, p. 60-65, maio/jun. 2001.

SEIGER, D. S. et al. Tannins from four common Acacia species of Texas and Northeastern México. **Economic Botany**, New York, v. 40, p. 220-232, 1986.

SERRA, A. G. P.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. Análises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 4, p. 833-840, jul./ago. 2000.

SHIMIZU, T. et al. Changes in metabolite levels during growth of *Acer pseudoplatanus* (sycamore) cells in batch suspension culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 40, n. 2, p. 125-129, 1977.

SINGLETON, V. L. et al. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: PACKER, L. (Ed.). **Oxidants and antioxidants: part A**. New York: Elsevier, 1999. p. 152-178. (Methods in Enzymology, 299).

SMITH, R. M. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. San Diego: Academic, 1992. 171 p.

STEIN, V. C. et al. Curva de crescimento e índice de divisão celular de calos de ingazeiro. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, v. 53, n. 2, p. 159-163, 2010.

STELLA, G. A.; BRAGA, M. R. Callus and cell suspension culture of *Rudgea jasminoides*, a tropical woody Rubiaceae. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 69, n. 3, p. 271-276, 2002.

SUDARMONOWATI, E. Cryopreservation of garlic (*Allium sativum*) cv. Lumbu Hijau using vitrification technique. **Annales Bogorienses**, Bogor, v. 8, n. 1, p. 39-47, Jan. 2001.

SUZUKI, M. et al. Development of a new vitrification solution, VSL, and its application to the cryopreservation of gentian axillary buds. **Plant Biotechnology Reports**, London, v. 2, n. 2, p. 123-131, June 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 820 p.

VERLEYSSEN, H. et al. 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.

CAPÍTULO 3

Cultivo *in vitro* e criopreservação de ápices caulinares de barbatimão

RESUMO

O barbatimão é uma planta medicinal do Cerrado brasileiro. A espécie possui diferentes efeitos medicinais, em virtude da alta concentração de taninos em diferentes partes da planta. A criopreservação é um método bastante utilizado na conservação de propágulos vegetativos de interesse medicinal e comercial. Objetivou-se neste trabalho testar a metodologia de “droplet-vitrification” na criopreservação de ápices caulinares de barbatimão. Foram realizados testes de cultivo de ápice, utilizando as concentrações de 0, 0,25, 1 e 2 mg L⁻¹ de BAP por 30 dias e teste de regeneração desses ápices com as concentrações de 0, 0,05, 0,25 e 1,25 mg L⁻¹ de GA₃ por 90 dias em meio MS. Para a criopreservação foram realizados testes de ápices imersos por diferentes períodos de tempo (15, 30, 45 e 60 minutos) em PVS2 antes do armazenamento em nitrogênio líquido. Realizaram-se, também, testes de cultivo dos ápices após a criopreservação, utilizando diferentes meios de cultura (MS, WPM e WPM_{1/2}) e diferentes concentrações de BAP (0,25 e 2 mg L⁻¹) e GA₃ (0, 0,05, 0,25 e 1,25 mg L⁻¹). Para o cultivo de ápices caulinares, não foi verificada diferença estatística para a sobrevivência dos ápices. A presença de calos foi observada em todos os tratamentos contendo BAP. Os maiores comprimentos das brotações foram para os ápices cultivados com 0,25 mg L⁻¹. No teste de regeneração não houve diferença significativa para a variável comprimento das brotações e número de folhas e gemas. Para o teste de toxicidade ao PVS2, o período de 60 minutos foi o mais prejudicial para os ápices. Para os testes de criopreservação de ápices caulinares, aqueles expostos por 15 e 30 minutos ao PVS2 apresentaram maiores porcentagens de sobrevivência. A presença de calos foi maior nos ápices não criopreservados que ficaram em PVS2 por 45 e 60 minutos. O teste com os diferentes meios de culturas não mostrou diferença nos resultados para a presença de calos. O uso de diferentes concentrações de GA₃ em combinação com 2 mg L⁻¹ de BAP proporcionou maiores comprimentos das brotações em relação à combinação do GA₃ com 0,25 mg L⁻¹ de BAP. Conclui-se que o método de “droplet-vitrification” pode ser utilizado para a criopreservação de ápices caulinares de barbatimão, mas novos trabalhos devem ser realizados para a otimização do protocolo.

Palavras-chave: “Droplet-vitrification”; PVS2; BAP; GA₃

ABSTRACT

Barbatimão tree is a medicinal plant from the Brazilian Cerrado. The species presents different medicinal effects due to a high concentration of tannins in different parts of the plant. Cryopreservation is a widely used method in the conservation of vegetative tissues of medicinal and commercial interest plants. The aim of this study was to test the methodology of "droplet-vitrification" in barbatimão tree shoot tips' cryopreservation. A protocol was tested for the growth of shoot tips was performed using different BA concentrations (0, 0.25, 1 and 2 mg L⁻¹) for 30 days, and the regeneration of shoot tips using different GA₃ concentrations (0, 0.05, 0.25 and 1.0, 2.5 mg L⁻¹) for 90 days on MS medium. For the cryopreservation, the shoot tips were immersed for different periods of time (15, 30, 45 and 60 minutes) in PVS2 before storage in liquid nitrogen. Different culture media (MS, WPM and WPM_{1/2}) and different BA (0.25 and 2.0 mg L⁻¹) and GA₃ (0, 0.05, 0.25 and 1.25 mg L⁻¹) concentrations were tested to optimize shoot tips regrowth after cryopreservation. No statistical difference was observed for the survival of shoot tips. The presence of calluses was observed in all treatments with BA. The largest shoot length was reached using 0.25 mg L⁻¹ of BA. No significant difference was observed regarding shoot length and number of leaves and buds in the shoot tips regeneration test. A toxicity effect was observed after shoot tips being exposed to PVS2 for 60 minutes. Among cryopreserved shoot tips, those exposed to PVS2 for 15 and 30 minutes presented higher survival percentages. The presence of calluses was higher in shoot tips which were not cryopreserved but exposed to PVS2 for 45 to 60 minutes. The use of different GA₃ concentrations in combination with 2 mg L⁻¹ of BA provided larger shoot length compared to the GA₃ combined with 0.25 mg L⁻¹ of BA. We conclude that the "droplet-vitrification" method may be used for barbatimão tree shoot tips cryopreservation, but further work should be undertaken to optimize this protocol.

Keywords: "Droplet-vitrification"; PVS2; BA, GA₃.

1 INTRODUÇÃO

A criopreservação, que é a conservação de material biológico em nitrogênio líquido (NL) a -196°C , é a única técnica disponível atualmente segura e de baixo custo para a conservação em longo prazo dos recursos genéticos de propagação vegetativa de espécies vegetais. A temperatura ultrabaixa do NL faz com que as reações metabólicas sejam reduzidas drasticamente, permitindo assim tempos de armazenamento teoricamente ilimitados (ENGELMANN, 2004).

A técnica de “droplet-vitrification”, inicialmente desenvolvido para ápices caulinares de banana (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005), consiste em acomodar os explantes em pequenas gotas de solução de vitrificação sobre tiras de papel alumínio, que são imersos rapidamente em nitrogênio líquido. O uso de tiras de papel alumínio, um bom condutor do calor e o contato direto das gotículas contendo os explantes com o nitrogênio líquido, durante o resfriamento ou com a solução de descarregamento, durante o reaquecimento, permite altas taxas de troca de temperatura (LEUNUFNA; KELLER, 2003). Altas taxas de resfriamento, cerca de $130^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (TOWILL; BONNART, 2003), facilitam a vitrificação intracelular enquanto o reaquecimento rápido reduz a possibilidade de recristalização do gelo intracelular, conduzindo assim à maior recuperação e sobrevivência (KIM et al., 2006; PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005).

O material criopreservado é protegido de estresses bióticos e abióticos que podem afetar coletas de campo e causar sérios danos. Além disso, o armazenamento em nitrogênio líquido exige manutenção limitada e espaço reduzido. Comparado à conservação *in vitro* tradicional (cultura de crescimento normal ou lenta), a criopreservação suprime o risco de ocorrência de variações somaclonais e de contaminação durante as transferências (ASHMORE, 1997).

Como outras técnicas baseadas em vitrificação, a “droplet-vitrification” requer solução de vitrificação para a desidratação do explante. Os crioprotectores penetrantes e não penetrantes contidos na solução de vitrificação reduzem o teor de água congelável na célula, permitindo a vitrificação das células durante o resfriamento, por meio da proteção de estruturas celulares durante a criopreservação. As soluções de vitrificação, apesar de sua ação útil durante a criopreservação, são altamente tóxicas. Desta forma, a composição da solução e a duração do tratamento devem ser cuidadosamente selecionadas dependendo do material vegetal (KIM et al., 2009).

A espécie [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] é uma planta medicinal do Cerrado, pertencente à família Fabaceae, também conhecida como barbatimão. Possui elevados teores de compostos polifenólicos na casca, especialmente taninos, em concentrações que variam de 20% a 30% (LIMA; MARTINS; SOUZA JÚNIOR, 1998).

Os estudos farmacológicos com o barbatimão demonstraram que este possui propriedades antiinflamatórias (LIMA; MARTINS; SOUZA JÚNIOR, 1998) além de proteger as mucosas gástricas (AUDI et al., 1999). Há também relatos de que extratos do barbatimãozeiro possuem efeito antimicrobianos (ISHIDA et al., 2006), antiviral (FELIPE et al., 2006), cicatrizante, antioxidante (LOPES et al., 2005), antiprotozoária (HOLETZ et al., 2005).

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de testar a metodologia de “droplet-vitrification” na criopreservação de ápices caulinares de barbatimão.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Os frutos de *S. adstringen* foram colhidos maduros, ainda fechados, de plantas de populações naturais localizadas na cidade de Ijací, região Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. Posteriormente as sementes foram extraídas manualmente dos frutos e aquelas que apresentavam boa integridade física foram selecionadas. Em seguida, as sementes foram transferidas para frascos de vidro e armazenadas em geladeira, a 4 °C, por 30 dias.

Antes da inoculação, as sementes sofreram escarificação ácida, ficando imersas por 60 minutos em ácido sulfúrico, 95 %, seguidas de lavagem em água corrente (MARTINS; NAKAGAWA, 2008). Depois, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram imersas em álcool etílico 70 % (v/v) por um minuto e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio 2 % por cinco minutos e lavadas em água destilada autoclavada por três vezes. Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescidos com 10 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar. Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância de fótons de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 \pm 2 °C.

Segmentos nodais de aproximadamente 2 cm foram inoculados em meio MS acrescidos com 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar. Após a inoculação, os segmentos nodais foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de fótons de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 \pm 2 °C. Após 30 dias de cultivo, os ápices caulinares obtidos das brotações foram utilizados como fonte de explantes.

2.2 Cultivo *in vitro* de ápice caulinar

Os ápices caulinares (0,5 – 1,0 mm) foram isolados com o auxílio de bisturi e lupa estereoscópica, sendo deixados no explante três ou quatro primórdios foliares recobrando o meristema apical. Os explantes foram inoculados em meio de cultura MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e diferentes concentrações de benzilaminapurina (BAP) (0,0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 mg L⁻¹). Após a inoculação, estes foram mantidos sob 16 horas de fotoperíodo em sala de crescimento. Foram utilizados dez explantes por tratamentos, sendo cada tratamento disposto em uma placa de petri descartável. Após 30 dias avaliou-se a sobrevivência dos ápices caulinares, utilizando como critério seu aspecto verde, formação de calos na base do explante e o comprimento das brotações.

2.3 Regeneração dos ápices caulinares

Ápices caulinares foram cultivados em meio MS suplementado com 0,25 mg L⁻¹ de BAP. Após 30 dias os ápices foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio MS suplementados com as concentrações de 0, 0,05, 0,25 e 1,25 mg L⁻¹ de GA₃. Após 90 dias avaliaram-se a regeneração, comprimento e número de folhas e gemas das brotações.

2.4 Tratamento com PVS2 e criopreservação

Ápices caulinares foram isolados e, utilizando o mesmo procedimento descrito na metodologia acima, foram inoculados em meio de cultura MS

suplementados com 0,3 M de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar, por 24 horas. Este processo foi denominado como pré-cultivo. Para o processo de criopreservação, os ápices caulinares foram imersos na solução de PVS2 (Plant Vitrification Solution 2) a 0°C nos tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos. Metade dos ápices foi armazenado por 1 hora em nitrogênio líquido e a outra metade não passou pelo processo de criopreservação (controle). Após esse período, os explantes foram descongelados em uma solução a 25°C contendo MS e 1,2 M de sacarose, ficando imersos por 15 minutos e, então, inoculados no meio de pós-cultivo por 2h horas, também contendo os sais do MS, 0,3M de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar. Os explantes foram transferidos para o meio MS contendo 0,25 mg L⁻¹ de BAP por 15 dias e depois para o meio MS na ausência do regulador de crescimento por mais 15 dias, em sala de crescimento sob 16 horas de fotoperíodo.

Foram utilizados sete explantes por tratamento, sendo cada tratamento disposto em uma placa de petri. Após 30 dias avaliaram-se a sobrevivência dos ápices caulinares e formação de calos na base do explante.

2.5 Teste com diferentes meios de cultura

A criopreservação usando os ápices caulinares foi executada como descrito acima, entretanto variaram-se os meios de cultura MS, WPM e WPM_{1/2} suplementado com 0,25 mg L⁻¹ de BAP para o estabelecimento *in vitro* dos ápices após o armazenamento em NL.

Foram utilizados dez explantes por tratamento, sendo cada tratamento disposto em uma placa de petri. Após 30 dias avaliaram-se a sobrevivência dos ápices caulinares e formação de calos na base do explante.

2.6 Teste com GA₃

A criopreservação usando os ápices caulinares foi executada como descrito acima, entretanto utilizaram-se as concentrações de 0, 0,05, 0,25 e 1,25 mg L⁻¹ de GA₃ no meio de cultura MS suplementado com 0,25 mg L⁻¹ ou 2 mg L⁻¹ de BAP para o estabelecimento *in vitro* dos ápices após o armazenamento em nitrogênio líquido. Foram utilizados dez explantes por tratamento, sendo cada tratamento disposto em uma placa de petri. Após 30 dias avaliaram-se a sobrevivência dos ápices caulinares e formação de calos na base do explante. Os ápices foram, então, transferidos para tubos de ensaio com meio MS suplementado com 0,25 e 2 mg L⁻¹ de BAP e as diferentes concentrações de GA₃ mencionadas acima. Após 150 dias avaliaram-se a regeneração dos ápices, o comprimento, o número de folhas e gemas das brotações. Foram utilizados apenas os ápices que sobreviveram ao experimento anterior e os resultados não foram submetidos à análise estatística, sendo apresentada apenas a média geral de cada tratamento.

2.7 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos ao software SISVAR (FERREIRA, 2011), para a realização das análises de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Cultivo *in vitro* de ápice caulinar

As avaliações realizadas com os ápices caulinares cultivados em diferentes concentrações de BAP mostraram que os dados não apresentaram diferença estatística para a sobrevivência dos explantes, apresentando valores médios de 94% (Figura 1A). Em todos os meios com a presença de BAP foi observada a formação de calos. Na concentração de 2 mg L⁻¹ de BAP foi observado 100% de formação de calos na base dos explantes (Figura 1B). Houve diferença estatística para o comprimento das brotações, observando maiores valores para os ápices cultivados com 0,25 mg L⁻¹ de BAP com média de 6,9 mm (Figura 1C; 2).

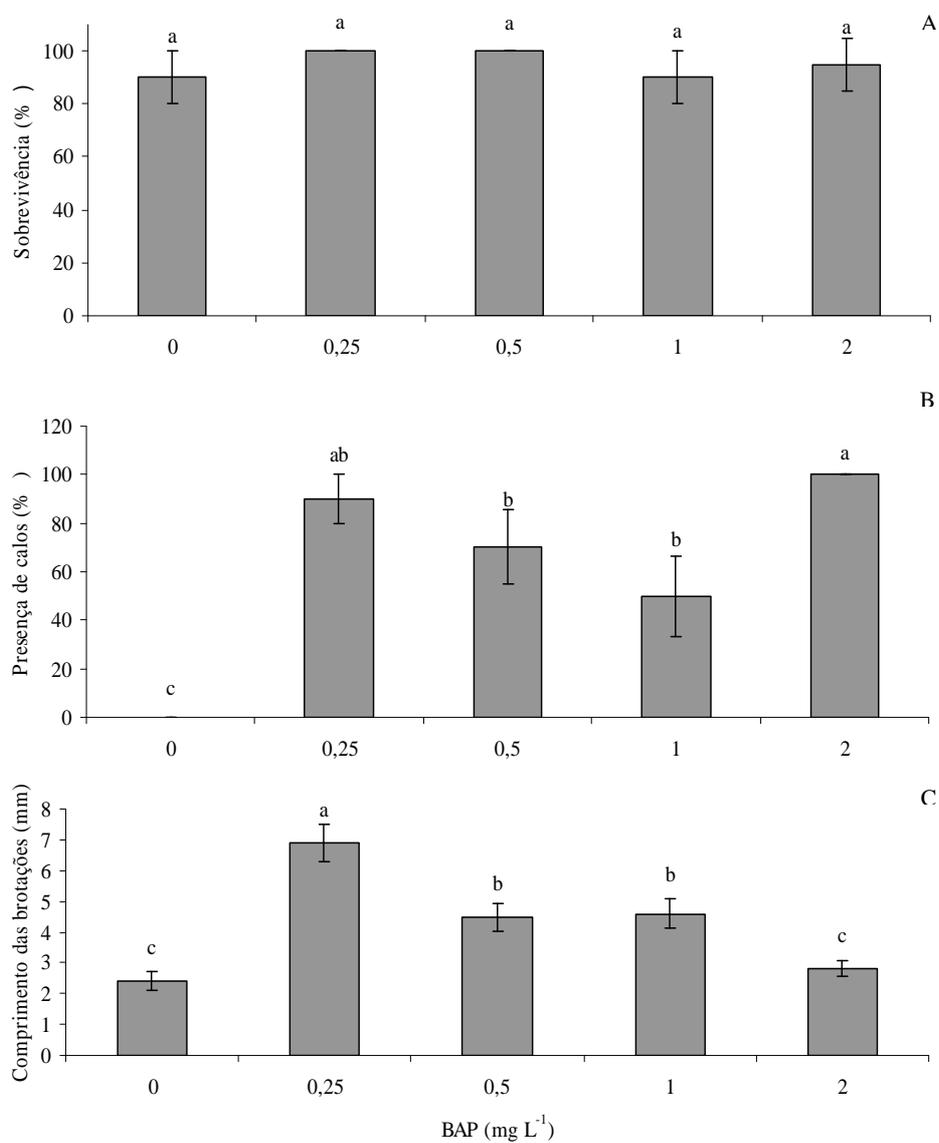


Figura 1 Valores médios de sobrevivência (A), presença de calos (B) e comprimento das brotações (C) em ápices caulinares cultivados *in vitro* com diferentes concentrações de BAP.

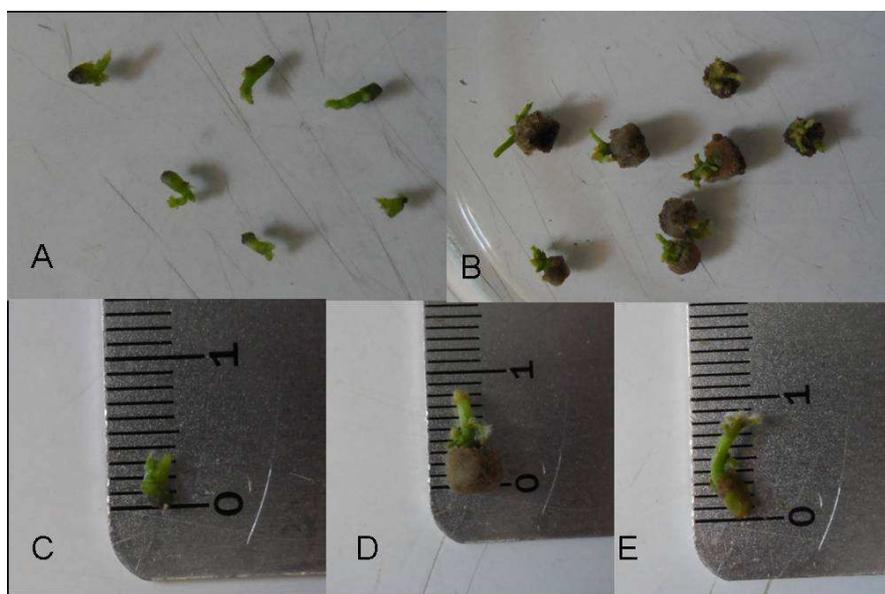


Figura 2 Ápices cultivados por 30 dias em meio MS na ausência de BAP (A, C), e na presença de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP (B,D,E).

Assim como neste trabalho, a eficiência no uso do BAP no cultivo *in vitro* de ápices caulinares também foi relatado por Silva et al., (2010) que, ao estudar o cultivo *in vitro* de ápices caulinares de sumaúma (*Ceiba pentandra*), observou efeito positivo no uso do BAP, verificando alongamento em 60% dos ápices cultivados com $2,2 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. Há relatos de que o BAP exerce efeito positivo estimulando a proliferação de brotos, mas também exerce efeito negativo inibindo o seu alongamento (BRASSARD et al., 1996; FIGUEIREDO; ALBARELLO; VIANA, 2001).

3.2 Regeneração dos ápices caulinares

A regeneração dos ápices caulinares cultivados em diferentes concentrações de GA₃ apresentou diferença estatística entre a ausência e a presença deste regulador, onde as maiores porcentagens de regeneração foram obtidas na presença desta (Figura 3).

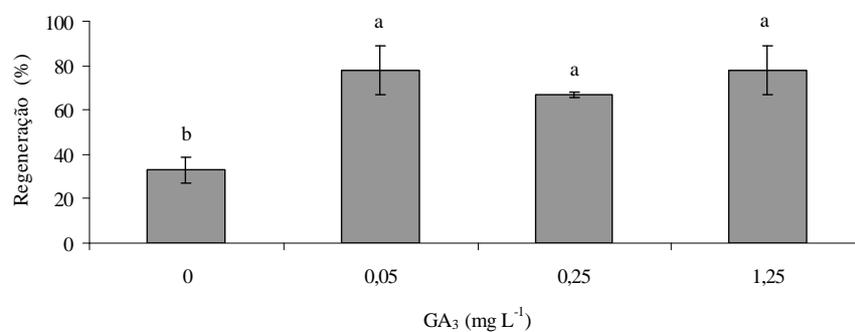


Figura 3 Valores médios da regeneração dos ápices caulinares cultivados em *in vitro* com 0,25 mg L⁻¹ de BAP e diferentes concentrações de GA₃.

As variáveis comprimento das brotações e número de folhas e gemas não apresentaram diferença estatística e obtiveram médias de 13,1 mm, 2,46 e 2,4, respectivamente (Figura 4).

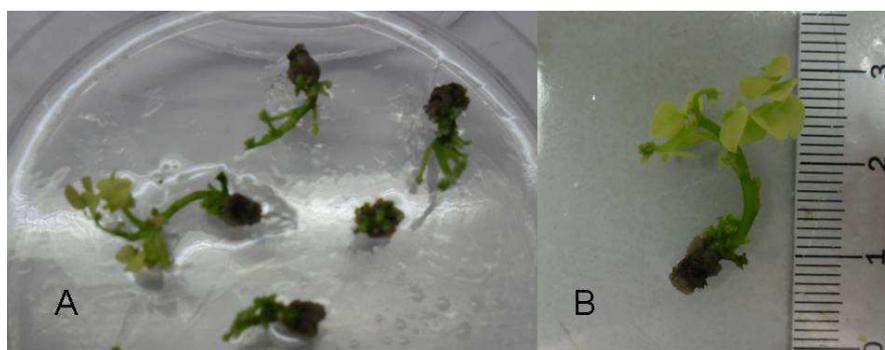


Figura 4 Ápices cultivados em meio MS contendo 0,25 mg L⁻¹ de BAP combinado com GA₃ (A,B)

Assim como neste experimento, o emprego de GA₃ na cultura de ápices caulinares mostrou efeito benéfico no crescimento destes explantes. Torres et al., (1996) verificaram que a adição combinada de cinetina e GA₃ propiciou o crescimento de 50-70% dos explantes, contrastando com os 75-90% obtidos com o uso apenas de GA₃. A formulação contendo 5,8 μM de GA₃ propiciou o desenvolvimento mais rápido dos explantes, formando plantas com até 40 mm de altura, em 50 dias de cultura. Zamora & Gruezo (1993) relataram que a utilização de citocinina combinado com GA₃ no meio MS propiciou a regeneração de 89 a 96% dos meristemas inoculados depois de 8 - 9 semanas de cultivo.

3.3 Tratamento com PVS2 e criopreservação

Os meristemas apresentaram diferentes níveis de toxicidade em relação ao tempo de exposição dos ápices caulinares no PVS2. O período de 60 minutos dos ápices no PVS2 foi o mais prejudicial, e diferiu estatisticamente dos demais tratamentos, apresentando menor porcentagem de sobrevivência dos ápices,

inclusive no tratamento controle. Os ápices que foram imersos no nitrogênio líquido apresentaram maiores porcentagens de sobrevivência quando os explantes ficaram na presença de PVS2 por 15 ou 30 minutos. A relação entre o tempo de exposição ao crioprotetor e o armazenamento ou não dos ápices no nitrogênio líquido mostrou diferença estatística para os tempos de exposição de 30 e 45 minutos no PVS2, onde os ápices criopreservados tiveram uma queda na porcentagem de sobrevivência em relação aos ápices não criopreservados (Figura 5A).

A presença de calos predominou em todos os tratamentos após o cultivo em meio MS suplementado com $0,25 \text{ mg L}^{-1}$. Entre os ápices que passaram apenas pelo teste de toxicidade ao crioprotetor, observaram-se maiores médias nos ápices imersos em PVS2 por 45 e 60 minutos. Entre os ápices criopreservados não se verificou diferença estatística entre os tratamentos, observando média de 33% de presença de calos na base dos explantes. Ao comparar a presença de calos entre os ápices imersos ou não imersos em nitrogênio líquido e os diferentes tempos dos explantes no crioprotetor, observou-se diferença estatística para os tempos de 45 e 60 minutos, onde os ápices não criopreservados apresentaram maiores porcentagens de formação de calos na base (Figura 5B, 6).

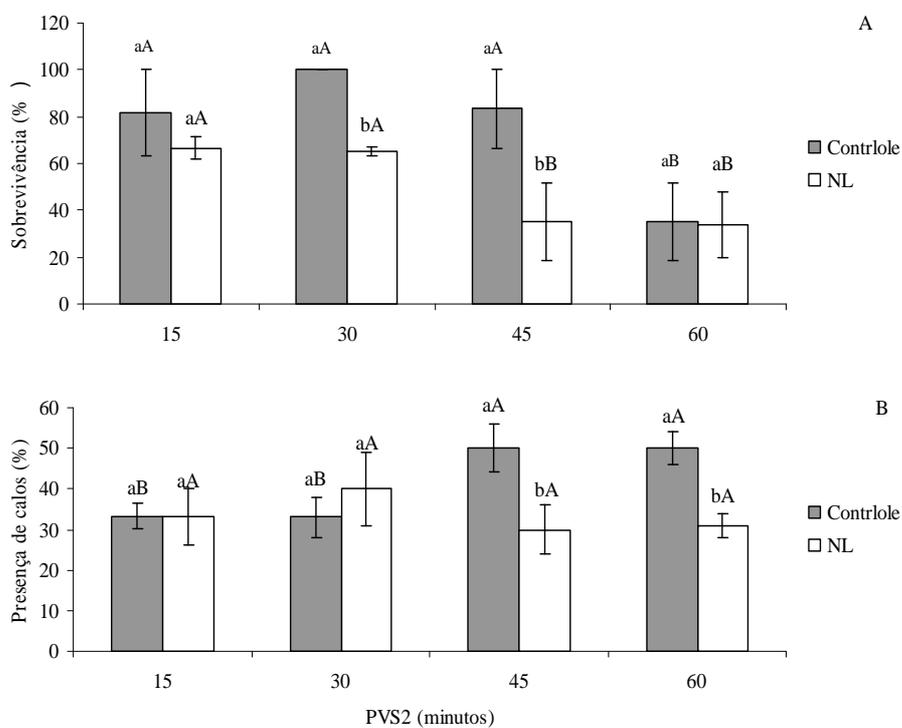


Figura 5 Valores médios de sobrevivência dos ápices (A) e presença de calos nos ápices (B) armazenados em nitrogênio líquido (NL) ou não armazenados em nitrogênio líquido (controle) cultivados em meio MS suplementado com $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. Letras maiúsculas são comparações entre os tempos de PVS2 e as letras minúsculas entre os controles e os criopreservados.

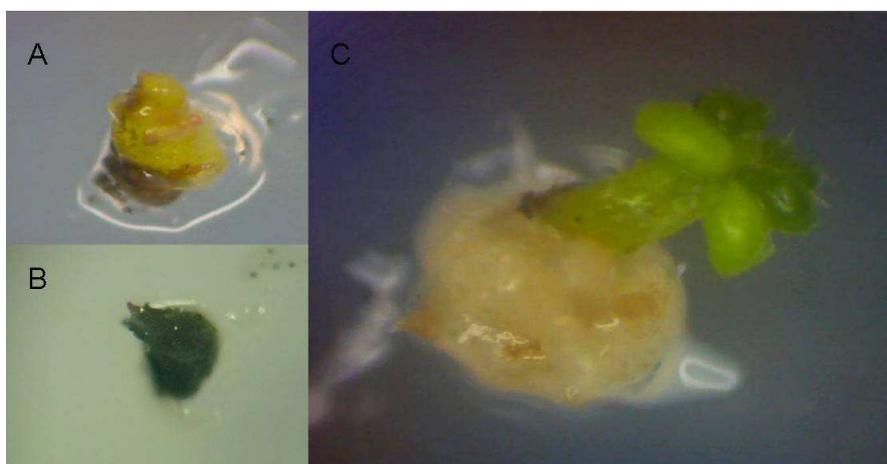


Figura 6 Ápice caulinar após a excisão (A), ápice morto (B) e vivo com calo na base (C) após a criopreservação cultivados por 30 dias em meio MS suplementado com $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP

A desidratação com elevada concentração de soluções crioprotetoras é um dos passos mais críticos no desenvolvimento de protocolos de vitrificação visando à criopreservação. Por isso, é de extrema importância observar a tolerância dos explantes à desidratação por solução de vitrificação (SAKAI; ENGELMANN, 2007). A aplicação de soluções de vitrificação é geralmente específica para cada espécie, e a duração do tratamento deve ser determinada com muita precisão, a fim de encontrar um equilíbrio correto entre a toxicidade e a desidratação adequada, a fim de reduzir a possibilidade de formação de cristais de gelo em tecidos criopreservados (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005).

O método de “droplet-vitrification” utilizado neste estudo, baseou-se no protocolo desenvolvido com meristemas de banana (PANIS et al., 2005). Panis et al., (2005) encontraram um aumento de regeneração de 42% para os ápices caulinares de banana de quatro grupos genômicos criopreservados por “droplet-vitrification” em comparação ao método de vitrificação tradicional anteriormente utilizado.

Um tratamento de osmoproteção eficaz parece ser essencial para a melhoria do crescimento pós-descongelamento. O pré-tratamento com altas concentrações de sacarose é muito eficaz na indução à tolerância à desidratação (SAKAI; HIRAI; NIINO, 2008). Além disso, eles apontaram que esse pré-tratamento deve ser adequado para espécies de plantas que são altamente sensíveis à solução de PVS.

No presente estudo, os ápices passaram pelo período de um dia de pré-cultivo em meio de cultura com 0,3 M de sacarose. O pré-cultivo também em meio MS, com concentrações elevadas de sacarose foi eficaz para a indução de osmotolerância ao PVS2 (NIINO et al., 2007). O pré-cultivo de ápices caulinares de morango em 0,3 M de sacarose e 2 M de glicerol (NIINO et al., 2003) durante um ou dois dias foi eficaz na promoção de um alto nível de regeneração.

O pré-tratamento de um dia em meio de cultura semi-sólido com 0,3 M de sacarose empregado por Matsumoto et al. (1998) para a criopreservação de *Limonium serotinum*, levou o aumento na recuperação dos ápices de 18% entre os controles não-tratados para 76% entre os que receberam o pré-tratamento.

3.4 Teste com diferentes meios de cultura

O cultivo de ápices caulinares criopreservados em diferentes meios de cultura suplementados com 0,25 mg L⁻¹ de BAP apresentou comportamento da sobrevivência dos explantes igual ao primeiro teste de criopreservação, apresentando maiores porcentagens para os ápices expostos ao PVS2 por 15 e 30 minutos antes da imersão em nitrogênio líquido. Os resultados não diferiram estatisticamente para a variável sobrevivência entre os meios de cultura testados (Figura 6A). A tentativa de diminuir a formação de calos na base dos explantes utilizando diferentes meios de cultura não demonstrou resposta positiva, pois

houve a presença de calos em todos os meios testados e seus resultados não diferiram estatisticamente (Figura 6B).

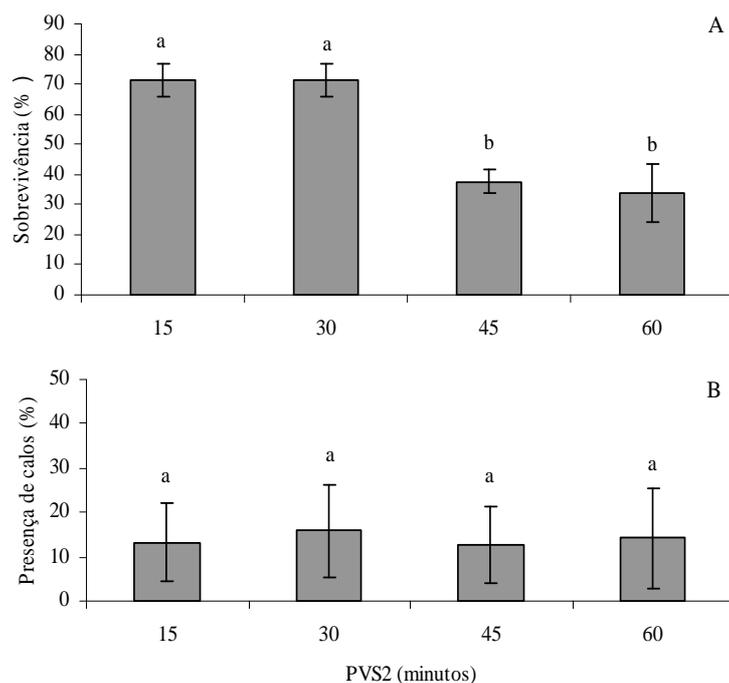


Figura 6 Valores médios de sobrevivência dos ápices (A) e presença de calos nos ápices (B) submetidos a diferentes tempos de exposição ao PVS2 e ao cultivo em meio de cultura MS, WPM ou WPM_{1/2} após a criopreservação.

Thinh, Takagi e Yashima (1999), trabalhando com diferentes acessos de banana, observaram presença de calos com o crescimento de pequenas áreas isoladas de tecidos primordiais. Esses calos não se regeneraram em brotos. Panis et al., 2005 notaram que, em experimentos de “droplet-vitrification” com ápices de banana, a quantidade de calos foi muito elevada, sugerindo os autores que provavelmente a calogênese seja em razão da toxicidade do PVS2.

Wang et al. (2000) observaram que a cultura de ápice, contendo diferentes concentrações de BAP, não influenciou significativamente na

sobrevivência de explantes de videira criopreservados, embora as maiores concentrações de BAP promoveram a formação de calos e reprimiu o alongamento dos ápices caulinares.

3.5 Teste com GA₃

O cultivo de ápices caulinares criopreservados submetidos a diferentes combinações de diferentes concentrações de BAP e GA₃ no meio de cultura MS não apresentou significância estatística para os resultados das variáveis sobrevivência e retomada do crescimento dos ápices, obtendo médias de 56% e 41%, respectivamente. Os resultados de comprimento das brotações mostraram que na presença de GA₃ os tratamentos com 2 mg L⁻¹ de BAP foram mais eficientes do que 0,25 mg L⁻¹ de BAP. Não foi observada diferença estatística dentro da combinação de 0,25 mg L⁻¹ de BAP com diferentes concentrações de GA₃ (Figura 7,8).

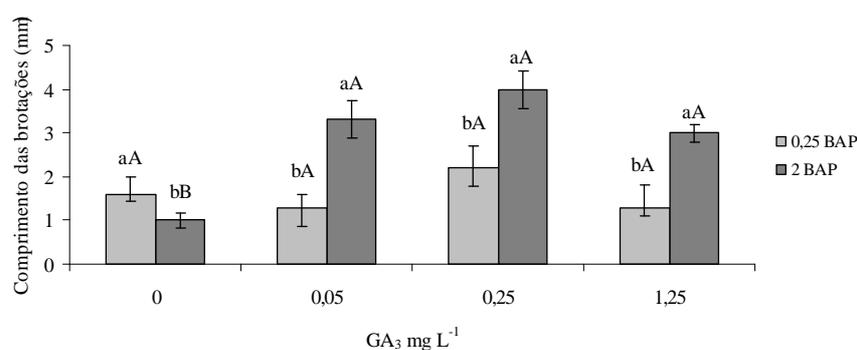


Figura 7 Valores médios do comprimento das brotações de ápices caulinares criopreservados cultivados em meio MS suplementado com a combinação de diferentes concentrações de BAP e GA₃. Letras maiúsculas são comparações entre dos tempos de PVS2 e as letras minúsculas entre os controles e os criopreservados.

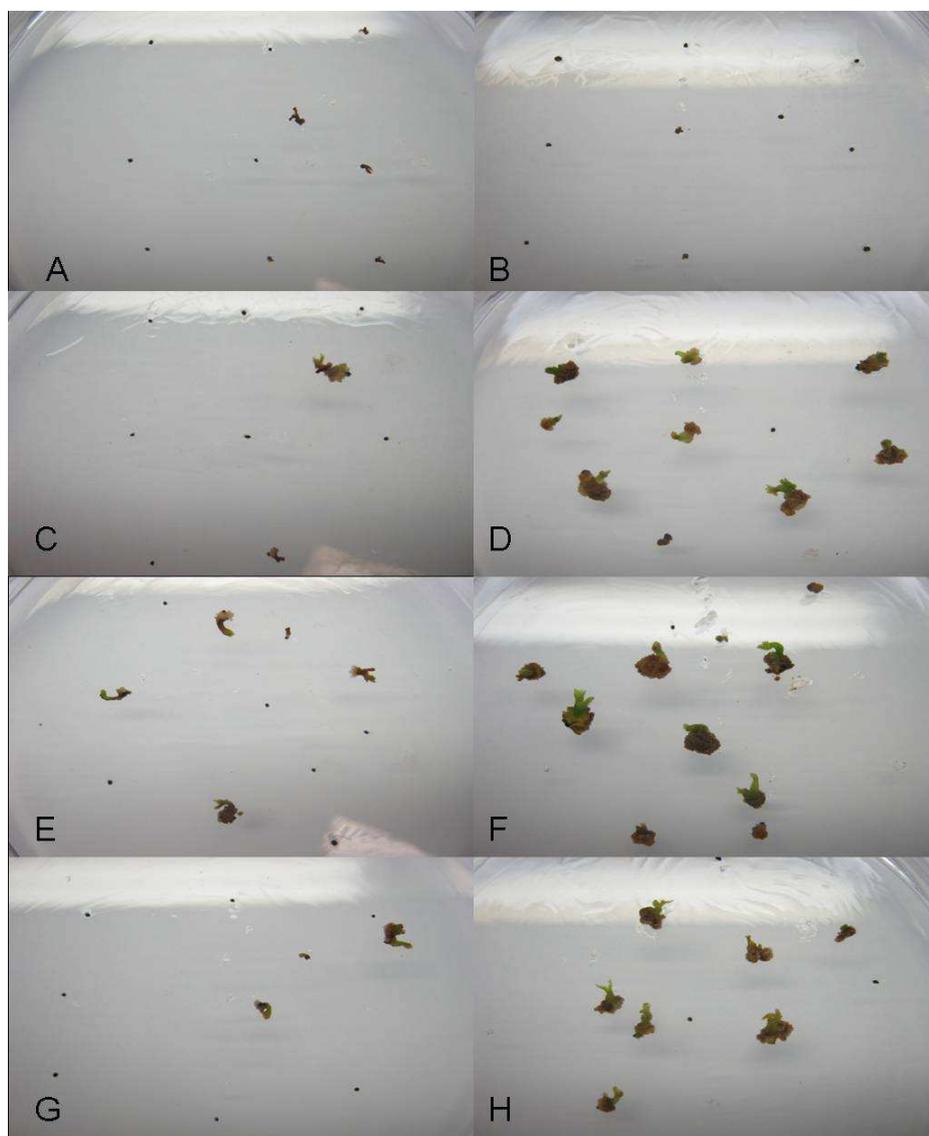


Figura 8 Ápices caulinares cultivados em meio MS suplementado com $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e combinado com as concentrações de 0; 0,05; 0,25 e $1,25 \text{ mg L}^{-1}$ de GA_3 (A,C,E,G) suplementado com 2 mg L^{-1} de BAP e combinado com as concentrações de 0; 0,05; 0,25 e $1,25 \text{ mg L}^{-1}$ de GA_3 (B,D,F,H).

Entre os ápices que foram transferidos para as diferentes concentrações de GA₃ verificaram-se os seguintes resultados: obteve-se a regeneração de um ápice caulinar para o tratamento com 0,05 mg L⁻¹ de GA₃, sua brotação medindo 4,4 cm de altura, com 7 folhas e 8 gemas laterais. Para o tratamento com 0,25 mg L⁻¹ de GA₃, observou-se a regeneração de dois ápices, com valores médios de: 58 cm de comprimento das brotações, 5,5 folhas e 8,5 gemas. No tratamento com 1,25 mg L⁻¹ de GA₃ verificou-se a regeneração de um ápice, com 46 cm de comprimento da brotação, 5 folhas e 8 gemas.

O ácido giberélico em baixas concentrações pode se tornar um ingrediente indispensável nos meios de cultura, dependendo da espécie vegetal em estudo. O GA₃ pode favorecer o crescimento e desenvolvimento de tecidos meristemáticos previamente formados. Uma baixa concentração de GA₃ é geralmente adicionada aos meios de cultura destinados ao desenvolvimento meristemático (GEORGE et al., 2008).

4 CONCLUSÕES

Conclui-se que o uso de BAP combinado com GA₃, nas concentrações estudadas são essenciais para o cultivo *in vitro* de ápice caulinar, e que a utilização da metodologia de “droplet-vitrification” demonstrou-se viável para a criopreservação e recomenda-se o período de 15 a 30 minutos de imersão dos ápices caulinares no crioprotetor PVS2 antes do armazenamento em nitrogênio líquido.

REFERÊNCIAS

ASHMORE, S. E. **Status report on the development and application of in vitro techniques for the conservation and use of plant genetic resources.** Rome: IPGRI, 1997. 67 p.

AUDI, E. A. et al. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. **Phytotherapy Research**, London, v. 13, n. 3, p. 264-266, May 1999.

BRASSARD, N. et al. Elongation, rooting and acclimatization of micropropagated shoots from mature material of hybrid larch. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 44, n. 1, p. 37-44, Jan. 1996.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular Developmental Biology Plant**, Columbia, v. 40, n. 5, p. 427-433, Sept./Oct. 2004.

FELIPE, A. M. M. et al. Antiviral effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on poliovirus and bovine herpesvirus. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 29, n. 6, p. 1092-1095, June 2006.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FIGUEIREDO, S. F. L.; ALBARELLO, N.; VIANA, V. R. C. Micropropagation of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. **In Vitro Cellular Developmental Biology Plant**, Columbia, v. 37, n. 4, p. 471-475, July/Aug. 2001.

GEETHA, N. et al. High frequency induction of multiple shoots and plant regeneration from seedling explants of pigeonpea (*Cajanus cajan*). **Current Science**, Bangalore, v. 75, n. 10, p. 1036-1040, Oct. 1998.

GEORGE, E. F. et al. **Plant propagation by tissue culture.** 3rd ed. Wageningen: Springer, 2008. v. 1, 501 p.

HOLETZ, F. B. et al. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 4, p. 397-401, 2005.

ISHIDA, I. et al. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 58, n. 5, p. 942-949, Sept. 2006.

JORDAN, M.; OYANEDEL, E. Regeneration of *Pouteria lucuma* (Sapotaceae) plants *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 31, n. 3, p. 249-252, Dec. 1992.

KIM, H. H. et al. Cryopreservation of garlic bulbil primordia by the droplet-vitrification procedure. **Cryo-Letters**, Cambridge, v. 27, n. 3, p. 143-153, May 2006.

_____. Development of alternative plant vitrification solutions in droplet-vitrification procedures. **Cryo-Letters**, Cambridge, v. 30, n. 5, p. 320-334, Sept./Oct. 2009.

LEUNUFNA, S.; KELLER, E. R. J. Investigating a new cryopreservation protocol for yams (*Dioscorea* spp.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, n. 12, p. 1159-1166, Aug. 2003.

LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; SOUZA JÚNIOR, P. T. de. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for anti-inflammatory activity. **Phytotherapy Research**, London, v. 12, n. 3, p. 212-220, May 1998.

LOPES, G. C. et al. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 99, n. 2, p. 265-272, June 2005.

MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J. Germination of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville seeds from different sources submitted to dormancy breaking treatments. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 32, n. 6, p. 1059-1067, nov./dez. 2008.

MATSUMOTO, T. et al. Cryopreservation of *in vitro* grown meristems of hybrid static by three different procedures. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 76, n. 1, p. 105-114, 1998.

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, Mar. 1962.

NIINO, T. et al. Cryopreservation of basal stem buds of in vitro-grown mat rush (*Juncus* spp.) by vitrification. **CryoLetters**, Cambridge, v. 28, n. 3, p. 197-206, May/June 2007.

_____. Cryopreservation of in vitro-grown apical shoot tips of strawberry by vitrification. **Plant Biotechnology**, Sheffield, v. 20, n. 1, p. 75-80, 2003.

PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant Science**, Limerick, v. 168, n. 1, p. 45-55, Jan. 2005.

PUROHIT, S. D.; SINGHVI, A. Micropropagation of *Achras sapota* through enhanced axillary branching. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 76, n. 3/4, p. 219-229, Aug. 1998.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and dropletvitrification: a review. **CryoLetters**, Cambridge, v. 28, n. 3, p. 151-172, May/June 2007.

SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. In: REED, B. (Ed.). **Plant cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer LLC, 2008. p. 33-58.

SANT, R.; TAYLOR, M.; TYAGI, A. Cryopreservation of in vitro-grown shoot-tips of tropical taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) by vitrification. **CryoLetters**, Cambridge, v. 27, n. 3, p. 133-142, May/June 2006.

SILVA, P. P. et al. Estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de sumaúma (*Ceiba pentandra* L. Gaertn). **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 11, n. 6, p. 437-443, nov./dec. 2010.

THINH, N. T.; TAKAGI, H.; YASHIMA, S. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of banana (*Musa* spp.) by vitrification method. **CryoLetters**, Cambridge, v. 20, n. 3, p. 163-174, 1999.

TORRES, A. C. et al. Recuperação de plantas de batata-doce livres de vírus a partir da regeneração direta de ápices caulinares. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 8, n. 3, p. 209-213, 1996.

TOWILL, L. E.; BONNART, R. Cracking in a vitrification solution during cooling or warming does not affect growth of cryopreserved mint shoot tips. **CryoLetters**, Cambridge, v. 24, n. 6, p. 341-346, Nov./Dec. 2003.

WANG, Q. et al. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of grapevine by encapsulation-dehydration. **Plant Cell Tissues and Organ Culture**, Dordrecht, v. 63, n. 1, p. 41-46, Jan. 2000.

ZAMORA, A. B.; GRUEZO, S. S. Meristem culture of sweet potato (*Ipomoea batatas*). **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, v. 91/92, p. 25-28, 1993.

CAPÍTULO 4

Determinação do teor de água para a criopreservação de sementes de barbatimão

RESUMO

O [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] é uma espécie típica do Cerrado brasileiro, com grande potencial econômico para a indústria farmacêutica, para o curtimento de couro e, recentemente, como adesivo para

compensados de madeira. A criopreservação de sementes é uma alternativa para a preservação de recursos genéticos vegetais em nitrogênio líquido. Objetivou-se neste trabalho criopreservar sementes de barbatimão com diferentes teores de água. Sementes com 6, 9 ou 12% de teor de água inoculadas em meio de cultura (controle) próprio para a germinação desta espécie ou armazenadas em nitrogênio líquido por 24 horas antes do descongelamento e inoculação em meio de germinação. Após 50 dias de cultivo, folhas de plântulas criopreservadas com os diferentes teores de água e folhas de plântulas não criopreservada (controle) foram coletadas e analisadas em citometria de fluxo com o objetivo de detectar se houve alteração na quantidade de DNA entre os tratamentos. Em outro ensaio, as sementes com seus diferentes teores de água foram armazenadas em nitrogênio líquido por diferentes períodos de tempo (30, 60 e 90 dias). Os resultados mostraram que a germinação não foi afetada pela diferença nos teores de água das sementes criopreservadas e não criopreservadas. As sementes que continham 6 e 9% de teor de água apresentaram maiores vigores em relação às sementes com 12%. Com a análise de citometria de fluxo pode ser verificado que a quantidade de DNA das plântulas provenientes de sementes criopreservadas não diferiu do controle. Conclui-se que as sementes de barbatimão com teores de água de 6 ou 9% são ideais para a o armazenamento em nitrogênio líquido.

Palavras-chave: Teor de água, germinação, vigor, citometria de fluxo.

ABSTRACT

The [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville], is a typical species of the Brazilian Cerrado, with great economic potential for the pharmaceutical industry, for tanning leather and recently, as an adhesive for plywood. Seed

cryopreservation is an alternative for preserving plant genetic resources in liquid nitrogen. The aim of this study was to cryopreserve barbatimão seeds with different moisture contents. Seeds with 6, 9 or 12% water content were inoculated in a culture medium (control) suitable for the germination of this species, or stored in liquid nitrogen for 24 hours before thawing and inoculation in germination medium. After 50 days of culture, leaves of cryopreserved seedlings with different water contents and leaves of seedlings not cryopreserved (control) were collected and analyzed by flow cytometry in order to detect changes in the amount of DNA between treatments. In another test, the seeds with different water contents were stored in liquid nitrogen for different time periods (30, 60 and 90 days). The results showed that the germination was not affected by the difference in moisture content for both cryopreserved and non-cryopreserved seeds. The seeds with 6 and 9% water content showed greater vigor. The flow cytometry analysis verified that the DNA amount of seedlings from cryopreserved seeds did not differ from control. We conclude that barbatimão seeds with water contents of 6 or 9% are ideal for storage in liquid nitrogen.

Keywords: Water content, germination, vigor, flow cytometry

1 INTRODUÇÃO

O [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville], pertencente à família Fabaceae, é uma espécie típica do Cerrado brasileiro, com grande distribuição e

importância econômica, sendo empregado na medicina popular principalmente em função de suas propriedades adstringentes e cicatrizantes e como agente antiinflamatório (LIMA; MARTINS; SOUZA JÚNIOR, 1998). Essas atividades estão diretamente associadas aos elevados teores de taninos (20 a 30%) encontrados no súber. Segundo Almeida et al. (1998), a produção nacional de casca de *S. adstringen* vem decrescendo em virtude da exploração indiscriminada pelas indústrias de curtimento do couro. Estudos recentes mostram a importância da espécie na utilização como aditivos, à base de sua grande quantidade de taninos, para colagem de compensados de madeira (ALMEIDA et al., 2010; GOULART et al., 2012). O *S. adstringen* é dispersado na natureza por meio de sementes cuja produção ocorre durante poucos meses do ano e o estabelecimento das mudas é prejudicado por condições ambientais desfavoráveis e pelo ataque de patógenos e herbívoros (FRANÇA et al., 1995).

O extrativismo desordenado da casca, que ocorre de forma independente do porte da planta, é exercido pela população local, estimulado por indústrias farmacêuticas e, aos poucos, vem provocando o esgotamento deste recurso genético. Assim, é uma espécie que necessita de diretrizes para a sua conservação como o desenvolvimento de técnicas de manejo sustentado e programas de domesticação e recomposição de matas nativas (BORGES FILHO; FELFILI, 2003).

A conservação de uma espécie pode ser feita por meio de bancos de sementes que constituem um método de conservação de recursos genéticos vegetais *ex situ* amplamente empregado. Em geral, o armazenamento de muitas espécies se faz em temperaturas e umidades baixas podendo, desta forma, serem preservados por décadas e, mais tarde, germinadas, sem prejuízo de sua viabilidade (VÁSQUES-YANES; OROZCO-SEGOVIA, 1993). Entretanto, recentemente, pesquisas a respeito da criopreservação de sementes de espécies de interesse econômico são cada vez mais evidentes, haja vista que a

criopreservação tem por função a preservação dos recursos genéticos dessas espécies para seleção, melhoramento genético e manutenção de estoques para o futuro. O desenvolvimento de protocolos de criopreservação tem permitido que sementes de diversas espécies possam ser armazenadas a um custo relativamente baixo, em um ambiente que possibilite a preservação da integridade física e biológica do produto agrícola (ENGELMANN, 2004; TOUCHELL; DIXON, 1994).

A criopreservação é uma técnica muito promissora para o armazenamento de recursos genéticos de plantas por longos períodos (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005; SAKAI; ENGELMANN, 2007; SKRLEP et al., 2008). A técnica de criopreservação consiste em conservar o material biológico a temperaturas ultrabaixas em nitrogênio líquido, a -196°C . Nesta temperatura, a divisão celular e os processos metabólicos são drasticamente reduzidos permitindo o armazenamento por tempo indefinido sem alterações em sua estrutura (SANTOS, 2000).

Diversas técnicas vêm sendo utilizadas para a criopreservação de diferentes partes vegetativas, como embriões somáticos e zigóticos, meristemas, calos e gemas. Porém, as sementes são mais adequadas para fins de conservação de uma espécie, por serem sistemas mais organizados. Entretanto, seu elevado teor de umidade dificulta a criopreservação, pois pode haver morte instantânea do material ao ser submetido ao nitrogênio líquido, em virtude da formação de cristais de gelo. Estudos sobre a relação entre os teores de umidade e o tempo de armazenamento, em diferentes espécies, mostram que não há um valor de umidade específico determinante, mas um intervalo de valores aceitáveis para a criopreservação. Contudo, recomendam-se para sementes, conteúdos de umidade abaixo de 10% (KERMODE; FINCH-SAVAGE, 2002).

Objetivou-se neste trabalho estudar o processo germinativo de sementes de *S. adstringens* com diferentes teores de água submetidos à criopreservação e por diferentes períodos de armazenamento em nitrogênio líquido.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Os frutos de *S. adstringen* foram colhidos maduros, ainda fechados, de plantas de populações naturais localizadas na cidade de Ijací, região Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. Posteriormente as sementes foram extraídas manualmente e selecionando aquelas que apresentavam integridade física. Em seguida, as sementes foram transferidas para frascos de vidro e armazenadas em refrigerador, a 4 °C, por 30 dias.

2.2 Criopreservação de sementes

O teor de água inicial das sementes foi determinado utilizando três amostras de 3 g de sementes (aproximadamente 40 sementes). As sementes foram pesadas e acondicionadas em folhas de papel alumínio (dimensão de 10 x 10 cm), com perfurações, e colocadas em estufa, a 105 ± 3 °C, durante 72 horas. Após este período, as sementes foram resfriadas em um secador com circulação constante de ar a 25 °C durante 15 minutos e submetidas à nova pesagem. A porcentagem do teor de água foi calculada com base no peso da matéria fresca, segundo as regras para análise de sementes (BRASIL, 1992).

$$TA (\%bu) = \frac{P_i - P_f}{P_i} 100\%$$

TA = teor de água, base úmida, %

P_i = peso inicial da amostra, g

P_f = peso final da amostra, g

Após o teor de água inicial das sementes ser determinado, dois outros lotes de sementes foram submetidos à secagem em sílica gel, para a obtenção dos demais teores de água (9 e 6%). Foram utilizadas caixas acrílicas do tipo

Gerbox[®], com dimensões de 11 cm x 11 cm x 3,5 cm, contendo 100 g de sílica gel. As sementes foram distribuídas uniformemente em uma única camada, em uma placa de petri, colocada sobre a sílica gel. As caixas foram tampadas e vedadas com filme PVC, permanecendo em ambiente fechado com temperatura de 25 ± 2 °C.

Esses teores de água foram obtidos com acompanhamento da perda do peso das sementes durante a secagem. Após aproximadamente 17 e 24 horas, as sementes atingiram 9% e 6% de teor de água, respectivamente. As matérias das amostras, correspondentes aos teores de água desejados, foram calculadas por meio da equação de Cromarty, Ellis e Roberts (1985):

$$M_f = M_i \frac{(100 - U_i)}{(100 - U_f)}$$

sendo:

M_f = peso da amostra (g) após a secagem;

M_i = peso da amostra (g) antes da secagem;

U_i = teor de água (%) antes da secagem;

U_f = teor de água (%) desejado após a secagem.

Após este processo, as sementes foram submetidas ao teste de germinação e de vigor.

2.3 Teste de germinação

Sementes com diferente teor de água (12, 9 e 6%) foram submetidas ou não ao congelamento em nitrogênio líquido. As sementes criopreservadas ou não

foram escarificadas em ácido sulfúrico, 95 % por 60 minutos e, em seguida, lavadas em água corrente (MARTINS; NAKAGAWA, 2008). Após a escarificação, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram imersas em álcool etílico 70 % (v/v) por um minuto e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio 2 % por cinco minutos e lavadas em água destilada autoclavada por três vezes. Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescidos com 10 g L^{-1} de sacarose e 7 g L^{-1} de ágar. Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância de fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. A avaliação foi realizada no 4º dia após a inoculação, considerando-se germinadas as sementes com protrusão radicular com aproximadamente 20 milímetros.

2.4 Teste de vigor

O vigor de sementes foi avaliado pelo comprimento da parte aérea e de peso de matéria seca das plântulas. O comprimento da parte aérea foi determinado aos 50 dias após a inoculação das sementes, tomando o comprimento das plântulas entre a região de transição da raiz-caule com a região do ápice caulinar. Determinou-se o peso da matéria seca das plântulas retirando-as do meio de cultura e colocando-as em sacos de papel que, separadas por tratamento e repetições, foram postas para secar em estufa a $80 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 72 horas. Decorrido este período, as amostras foram resfriadas em um dessecador durante 15 minutos e, logo após, pesadas em balança eletrônica.

2.5 Análise de conteúdo de DNA

As análises por citometria de fluxo visando estimar o conteúdo de DNA foram avaliadas no citômetro de fluxo que se encontra no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. Para as análises, foram utilizadas três amostras para cada tratamento (plântulas provenientes de sementes não criopreservadas – controle; plântulas provenientes de sementes com 6, 9 e 12% de teor de água, criopreservadas por 24 horas em nitrogênio líquido). Folíolos jovens provenientes de plântulas *in vitro* foram utilizados como amostras para quantificar o DNA em citometria de fluxo.

Foram utilizadas aproximadamente 20-30 mg de folíolos das plântulas e fragmentos de folhas do padrão de referência externo (*Pisum sativum*) para a determinação do conteúdo de DNA. As amostras foram trituradas em placa de Petri contendo 1,0 mL de tampão de extração LB01 (15 mM Tris; 2 mM Na₂EDTA; 0,5 mM NaCl; 0,1% (v/v) Triton X-100; pH 7,5) gelado para a liberação dos núcleos, segundo a metodologia de Dolezel, Binarova e Lucretti (1989). A suspensão de núcleos foi aspirada por meio de duas camadas de gaze, com auxílio de uma pipeta plástica e filtrada por uma malha de 50 µm. Os núcleos foram corados pela adição de 25 µL de uma solução de 1,0 mg/1,0 mL de iodeto de propídeo.

O conteúdo de DNA nuclear em picogramas (pg) das plântulas foi estimado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{DNA amostra} = \left(\frac{\text{G1 amostra}}{\text{G1 padrão}} \right) \times \text{DNA padrão}$$

A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (BD, Biosciences, San Jose, CA, USA) e os histogramas obtidos com o software Cell Quest (Becton Dickinson e Companhia, San Jose, CA, USA) e analisados estatisticamente no software WinMDI 2.8 (SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE, 2012).

2.6 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com dez repetições de oito sementes cada para o teste de germinação e dez repetições de cinco sementes cada para o teste de vigor.

Os dados foram submetidos ao software SISVAR (FERREIRA, 2011), para a realização das análises de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As avaliações realizadas com as sementes apresentando diferentes teores de água indicaram que a germinação não foi afetada pela dessecação (média de 87,8% de protrusão radicular). O comprimento da parte aérea apresentou diferença significativa, onde sementes com 12% de teor de água apresentaram comprimento inferiores em relação às plântulas provenientes de sementes que apresentavam 6 ou 9% de umidade após a dessecação. Para o peso da matéria seca das plântulas, as sementes com 9% de teor de água apresentaram valores significativamente maiores que as sementes com 6 e 12% (Tabela 1).

Entre as sementes criopreservadas, observou-se que as amostras com os teores de água com 6 e 9% obtiveram médias significativamente maiores que as sementes com 12% de teor de água para o comprimento de parte aérea das plântulas. A comparação do armazenamento ou não das sementes, não mostrou diferença significativa para as sementes com 6 e 12%, apenas para 9% de teor de água, com queda dos valores médios de comprimento de parte aérea das sementes criopreservadas em relação às sementes não armazenadas. As médias dos pesos da matéria seca das plântulas obtiveram maiores valores para as sementes criopreservadas com 6 e 9%, mas em relação às sementes com os mesmos teores de água, observou-se uma queda nos valores. Apenas as sementes com 12% não diferiu significativamente entre as sementes criopreservadas e não criopreservadas (Tabela 1) e (Figura 1).

Tabela 1 Valores médios do comprimento da parte aérea (CPA) e peso da matéria seca (PMS) de plântulas *in vitro* provenientes de sementes com diferente teor de água, não armazenadas (-NL) ou armazenadas em nitrogênio líquido (+NL) por 24 horas.

Teor de água (%)	CPA (mm)		PMS (g)	
	-NL	+NL	-NL	+NL
6	109,4 aA	101,1 aA	0,038 bA	0,033 aB
9	113,7 aA	103,7 aB	0,043 aA	0,032 aB
12	94,3 bA	84,5 bA	0,027 cA	0,026 bA

As médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas, para cada variável CPA ou PMS e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

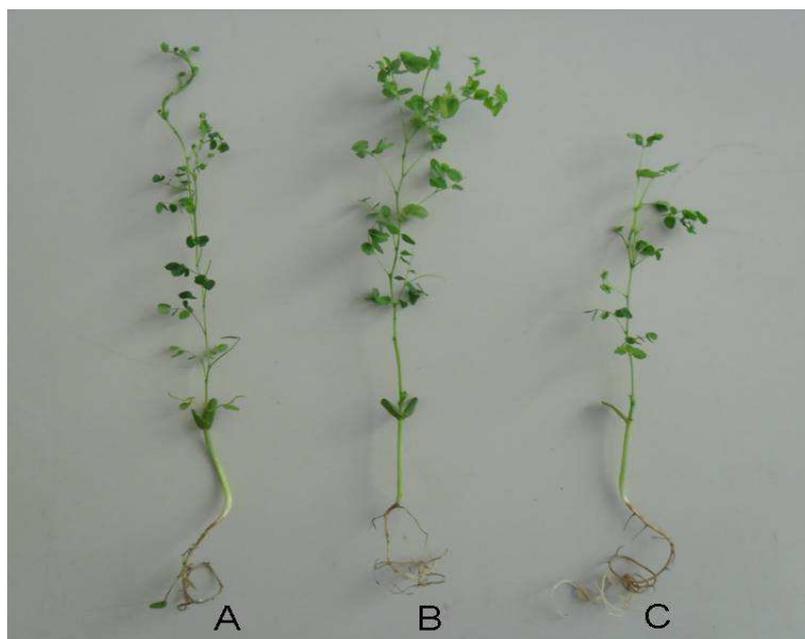


Figura 1 Plântulas provenientes de sementes submetidas ao teor de água de 6 (A), 9 (B) e 12% (C) antes da criopreservação.

Resultados semelhantes foram descritos por Castro, Mata e Braga (2001), quando estudaram diferentes teores de água para criopreservação de sementes de urucum (*Bixa orella* L.) e observaram que entre os valores estudados de 6 a 12%, não houve diferença significativa para a variável germinação, que obteve média de 87%.

Quando a semente se encontra excessivamente hidratada pode ocorrer, durante o congelamento, a formação de cristais de gelo a partir da água livre presente no interior das células (SANTOS, 2000), acarretando injúrias celulares irreversíveis e causando a perda da capacidade germinativa. A umidade das sementes é um dos principais fatores que afetam a criopreservação (WALTERS; WHEELER; STANWOOD, 2004). Para sementes ortodoxas, recomenda-se umidade abaixo de 10%, porém, o intervalo de umidade favorável para o congelamento difere entre as espécies.

Tresena et al. (2010), ao criopreservarem sementes de ipê amarelo (*Tabebuia chrysotrica*) verificaram que quanto menor era o teor de água (12, 10, 8, 6 e 4%), melhor foi a germinação e o vigor das sementes. E Goldfarb, Duarte e Mata (2008) observaram que sementes com teores de água de 6 a 8% não alteraram o vigor das sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas*), havendo queda do vigor apenas em sementes com maiores teores de água, após a criopreservação. Os autores também relataram que não houveram diferenças significativas para a germinação das sementes submetidas a diferentes teores de água, assim como foi observado neste trabalho.

Com relação ao conteúdo de DNA, as amostras de núcleos isolados das folhas das plantas controle e das plantas com diferentes teores de água e criopreservadas por 24 horas não apresentaram diferenças estatísticas e sem alteração no nível de ploidia (Figura 1).

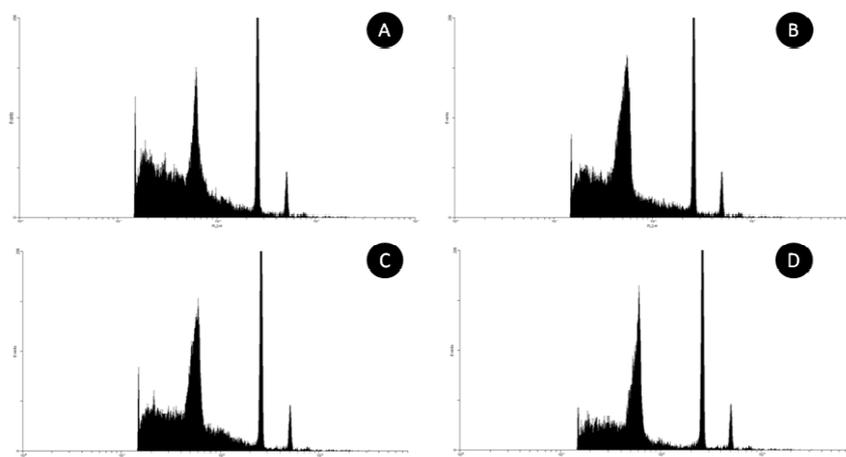


Figura 1 Histogramas de DNA de preparações nucleares de plântulas *in vitro* de *S. adstringens*. Primeiro pico: (A) folíolos de plântulas obtidas de sementes não imersas no LN; (B) folíolos de plântulas obtidas de sementes com 6% de teor de água imersas no LN; (C) folíolos de plântulas obtidas de sementes com 9% de teor de água imersas no LN; (D) folíolos de plântulas obtidas de sementes com 12% de teor de água imersas no LN. Segundo pico: representa a fase G1 de ervilha (*Pisum sativum* L.) usada como padrão.

Hirano et al. (2005) utilizaram a citometria de fluxo para examinar o nível de ploidia de plântulas de uma espécie de orquídea (*Bletilla striata*) submetidas à criopreservação também observaram o mesmo pico de conteúdo de DNA e mesmo nível de ploidia.

As avaliações de estabilidade genética e molecular pós-congelamento são essenciais se a criopreservação for utilizada como armazenamento de germoplasma de plantas (LARKIN; SCOWCROFT, 1981).

Na Tabela 2, as sementes submetidas aos diferentes teores de água foram armazenadas em nitrogênio líquido por diferentes períodos. Não obtiveram diferença significativa para a germinação das sementes induzidas aos diferentes teores de água, observando média geral de 89,8%. As sementes

armazenadas por 30, 60 e 90 dias apresentaram comprimento da parte aérea maiores para as sementes com teores de água com 6 e 9%.

Tabela 2 Valores médios de comprimento da parte aérea (mm) das plântulas *in vitro* provenientes de sementes com diferente teor de água, submetidas a diferentes períodos de armazenamento em nitrogênio líquido.

Teor de água das sementes (%)	Períodos de armazenamento (Dias)		
	30	60	90
6	87,38 a	101,56 a	89,56 ab
9	91,38 a	107,02 a	95,92 a
12	73,48 b	86,74 b	82,06 b

As médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação ao peso da matéria seca das plântulas, observou-se comportamento diferente entre os períodos de armazenamento. Sementes com teores de água de 6 e 9% apresentaram maiores valores médios para o peso da matéria seca para as sementes armazenadas por 30 e 90 dias. Aos 60 dias, as plântulas provenientes de sementes com 9% de teor de água apresentaram diferenças significativas com relação à variável peso da matéria seca das plântulas, apresentando maior média (Tabela 3).

Tabela 3 Valores médios de peso da matéria seca de plântulas (g) submetidas a diferentes períodos de armazenamento

Teor de água das sementes (%)	Períodos de armazenamento (Dias)		
	30	60	90
6	0,0359 a	0,0306 b	0,0312 ab
9	0,0403 a	0,0359 a	0,0365 a
12	0,0209 b	0,0227 c	0,0309 b
CV (%) = 16,0			

As médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste deTukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Almeida et al. (2002) observaram resultados diferentes para mamona (*Ricinus communis*) com redução na germinação e no peso da matéria seca das plântulas em sementes com 12% de teor de água em relação a 4, 6, 8 e 10%. Apesar do presente trabalho não ter comparado as médias para o teste de germinação e vigor das sementes submetidas a diferentes períodos de armazenamento em nitrogênio líquido, percebeu-se que as médias obtidas não variaram muito, podendo sugerir que os diferentes períodos de armazenamento não afetaram de forma brusca, tanto na germinação, quanto no vigor das sementes de barbatimão. Goldfarb, Duarte e Mata (2010), ao analisarem sementes de pinhão-manso sem levar em consideração seu teor de umidade, relataram que as sementes, após 90 dias de exposição ao nitrogênio líquido, mantiveram percentual de germinação estável.

A criopreservação de material biológico em nitrogênio líquido pode assegurar a conservação, por período prolongado, uma vez que nessas temperaturas ultrabaixas o metabolismo celular fica tão reduzido que a deterioração biológica é quase paralisada (SANTOS, 2004).

4 CONCLUSÕES

Conclui-se que a criopreservação de sementes de bartatimão deve ser realizada com sementes submetidas a teores de água entre 6 e 9% antes do armazenamento em nitrogênio líquido. O armazenamento de sementes em nitrogênio líquido até aos 90 dias não prejudica a viabilidade das sementes.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. de A. C. et al. Crioconservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 6, n. 2, p. 295-302, 2002.
- ALMEIDA, N. F. et al. Estudo da reatividade de taninos de folhas e cascas de barbatimão *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 38, n. 87, p. 401-408, 2010.
- ALMEIDA, S. P. de et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464 p.
- BORGES FILHO, H. C.; FELFILI, J. M. Avaliação dos níveis de extrativismo da casca de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] no Distrito Federal, Brasil. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 27, n. 5, p. 735-745, set./out. 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.
- CASTRO, A. A.; MATA, M. E. R. M.; BRAGA, M. E. D. Teor de umidade limite para crioconservação de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.). **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, Viçosa, MG, v. 5, p. 17-22, 2001.
- CROMARTY, A. S.; ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. **Design of seed storage facilities for genetic conservation**. Rome: International Board of Plant Genetic Resources, 1985. 100 p.
- DOLEZEL, J.; BINAROVA, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 31, n. 1, p. 113-120, Feb. 1989.
- ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular Developmental Biology Plant**, Columbia, v. 40, n. 5, p. 427-433, Sept./Oct. 2004.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FRANÇA, S. C. et al. Micropropagation of *Stryphnodendron polyphythum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 42, n. 3, p. 291-293, Sept. 1995.

GOLDFARB, M.; DUARTE, M. E. M.; MATA, M. E. R. M. C.
Armazenamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)
Euphorbiaceae. **Biotemas**, Florianópolis, v. 23, n. 1, p. 27-33, mar. 2010.

GOULART, S. L. et al. Resistência ao cisalhamento de painéis compensados produzidos com adesivo à base de taninos de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão). **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 19, n. 3, p. 308-315, jul./set. 2012.

HIRANO, T. et al. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, n. 8, p. 534-539, Jan. 2005.

KERMODE, A. R.; FINCH-SAVAGE, B. E. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Ed.). **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford: CABI, 2002. p. 149-184.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 60, p. 197-214, 1981.

LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; SOUZA JÚNIOR, P. T. de. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for anti-inflammatory activity. **Phytotherapy Research**, London, v. 12, n. 3, p. 212-220, May 1998.

MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J. Germination of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville seeds from different sources submitted to dormancy breaking treatments. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 32, n. 6, p. 1059-1067, nov./dez. 2008.

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, Mar. 1962.

PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant Science**, Limerick, v. 168, n. 1, p. 45-55, Jan. 2005.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and dropletvitrification: a review. **CryoLetters**, Cambridge, v. 28, n. 3, p. 151-172, May/June 2007.

SANTOS, I. R. I. **Criopreservação de eixos embrionários de espécies de Citrus usando encapsulamento e desidratação**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 2004. 23 p. (Documentos, 115).

_____. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, p. 70-84, 2000. Edição especial.

SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE. **FACS core facility**. Disponível em: <<http://facs.scripps.edu/software.html>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

SKRLEP, K. et al. Cryopreservation of cell suspension cultures of *Taxus × media* and *Taxus floridana*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 52, n. 2, p. 329-333, Jan. 2008.

TOUCHELL, D. H.; DIXON, K. W. Cryopreservation for seedbanking of australian species. **Annals of Botany**, London, v. 74, n. 5, p. 541-546, 1994.

TRESENA, N. L. et al. Determinação do teor de água limite para criconservação das sementes de ipê amarelo (*Tabebuia chrysotrica* (Mart. Ex. DC.) Standl.). **Cerne**, Lavras, v. 16, n. 2, p. 171-175, abr./jun. 2010.

VÁSQUES-YANES, C.; OROZCO-SEGOVIA, A. Patterns of seed longevity and germination in the tropical rain forest. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 24, p. 69-87, 1993.

WALTERS, C.; WHEELER, L.; STANWOOD, P. C. Longevity of cryogenically stored seeds. **Cryobiology**, San Diego, v. 48, n. 3, p. 229-244, June 2004.