



CRIOPRESERVAÇÃO DE EXPLANTES DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.) PELOS MÉTODOS DA VITRIFICAÇÃO

Maria do Socorro Rocha¹, Napoleão Esberard de M. Beltrão², Francisco de Assis C. Almeida³, Ailton Melo de Moraes³, Maria Sueli Rocha Lima¹

¹ UFPB, marialirium@hotmail.com, ² Embrapa Algodão, napoleão@cnpa.embrapa.br, ³ UFCG

RESUMO – [Objetivou-se avaliar procedimentos de criopreservação do eixo embrionário do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) e contribuir com a conservação a longo prazo dos recursos genéticos dessa espécie. Sementes do pinhão manso do acesso do Garanhuns-PE. Foram devidamente esterilizadas e extraído o eixo embrionário, quando se procedeu a excisão dos eixo embrionário sem cotilédones e eixo embrionário com os cotilédones de aproximadamente 5 a 7 mm. Os explantes obtidos foram submetidos aos processos de vitrificação. A vitrificação se deu por meio do pré-cultivo por 48 horas, em meio MS líquido contendo DMSO (0; 5; 10 e 15%) e/ou sacarose (0; 0,1; 0,25 e 0,5 M). Os explantes vitrificados foram colocados em tubos criobiológicos de polipropileno estéreis de 4,5 mL (quatro réplicas de 10 explantes/tubo), os quais foram devidamente selados e imersos diretamente no nitrogênio líquido (-196°C) durante cinco dias. O descongelamento dos explantes se deu pela imersão dos criotubos em água à sob condições de ambiente à 25±2°C por 60 minutos, procedendo-se em seguida seu cultivo em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio MS com 30 g.L⁻¹ de glicose, 10 mL.L⁻¹ de cloreto de magnésio e 2 g.L⁻¹ de gelrite e pH ajustado para 5,7. Avaliações dos explantes foram realizadas antes e após criopreservação, por meio da porcentagem de regeneração, número e comprimento de brotos emitidos após quatro semanas de cultivo. O pré-cultivo dos explantes no meio de vitrificação com DMSO em concentração superior a 7% ou associado com sacarose a 0,1; 0,25 e 0,5 M afetou a viabilidade dos explantes.

Palavras-chave – regeneração, eixo embrionário, sacarose, explantes.

INTRODUÇÃO

O melhoramento de plantas tem contribuído para o aumento da produção em diversas culturas comerciais de grande relevância em todo o mundo. A obtenção de variedades de alto rendimento e resistência a pragas e doenças requer que os recursos genéticos desejáveis de determinada espécie se encontrem disponíveis para sua utilização; desta forma as coleções de germoplasma passam a ter papel fundamental nos programas de melhoramento (SILVA *et al.*, 2007).





O cultivo de eixos embrionários se tornou uma ferramenta indispensável na propagação clonal e na eliminação de patógenos virais de muitas plantas cultivadas (KARTHA *et al.*, 1979). Como as células constituintes do eixos embrionários são menos diferenciadas e mais uniformes do que aquelas de tecidos maduros, plantas regeneradas pelo cultivo *in vitro* dos eixos embrionários devem garantir a recuperação tal qual sua progênie. Além disso, o meristema tem uma maior habilidade para regenerar a planta inteira do que o cultivo de células adultas. Então, a conservação de eixos embrionários excisados em nitrogênio líquido a -196°C (criopreservação), é potencialmente um meio satisfatório e seguro para a conservação de germoplasma vegetal (KARTHA, 1985).

Na atualidade, a criopreservação de eixos embrionários pode ser a metodologia mais apropriada para a conservação a longo prazo, da diversidade genética de várias espécies problemáticas ou de difícil conservação, por se tratar de uma estrutura de tamanho reduzido, ocupando o mínimo espaço possível no armazenamento e por tolerar condições que seriam letais para a semente inteira (BERJAK *et al.* 2000)

A presente pesquisa teve como objetivo estudar procedimentos de vitrificação e dessecação de explantes dos acessos de Pinhão manso, seu efeito imediato e após armazenamento criogênico, sobre sua capacidade de regeneração *in vitro*, como forma de assegurar a conservação, a longo prazo, dos recursos genéticos dessa espécie.

METODOLOGIA

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Centro Nacional de Pesquisa da EMEPA, em João Pessoa, PB. Utilizaram-se as sementes obtidos o acesso de pinhão manso da região Garanhuns-PE, cultivadas *in vitro*.

Na obtenção das sementes do pinhão manso foram devidamente esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio comercial (Brilux) a 40% (v/v), com 50% de cloro ativo, acrescida com 1-2 gotas de polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween-20®), sob agitação, durante 20 minutos, seguida de tríplice lavagem em água bidestilada esterilizada; em seguida e sob condições estéreis da câmara de fluxo laminar, sementes foram postas para germinar em tubos de ensaio de 25 x 250 mm contendo 10 mL de meio com sais minerais MS de Murashige e Skoog (1962) suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 5,5 g.L⁻¹ de ágar-ágar e pH ajustado para 5,7 antes da adição do solidificante ao meio. Sementes cultivadas foram mantidas na ausência de luz, até proteção da radícula e então levadas para câmara de crescimento, com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16/8 horas (claro/escuro) e





intensidade luminosa em torno de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, proporcionada por lâmpadas fluorescentes brancas frias. Após 25 dias de cultivo, procedeu-se, a partir daquelas plântulas, a excisão dos explantes (eixo embrionário sem cotilédones e eixo com cotilédones de aproximadamente 5 a 7 mm), sob condições assépticas da câmara de fluxo laminar.

Os explantes obtidos foram pré-cultivados em meio MS líquido, contendo um dos agentes crioprotetores ou sua combinação, em diferentes concentrações: dimetilsulfóxido – DMSO (Me_2SO) 0; 7; 14 e 20 % e sacarose 0; 0,1; 0,25 e 0,5 M e mantidos incubados em câmara de crescimento sob as condições mencionadas acima, por 48 horas (Figura 1).

Para avaliar o efeito da solução crioprotetora na regeneração, parte dos explantes pré-cultivados foi, imediatamente, cultivados *in vitro* e outra parte foi posta em tubos criobiológicos de polipropileno estéreis de 4,5 mL, em número quatro réplicas de 10 explantes por tubo, os quais foram devidamente selados e imersos diretamente no nitrogênio líquido (-196°C) onde permaneceram pelo tempo de cinco dias.

O descongelamento dos explantes crioconservados ocorreu pela imersão dos criotubos, contendo os explantes, durante 1-2 minutos e pela manutenção do material em condições de ambiente ($25\pm 2^\circ\text{C}$) pelo tempo de 60 minutos e, posteriormente, cultivados *in vitro*.

Os dados foram analisados segundo o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial $2 \times 4 \times 4$, sendo dois explantes (eixo embrionário e eixo com cotilédono), quatro concentrações do DMSO (0, 7, 14 e 20%) e quatro concentrações de sacarose (0; 0,1; 0,25 e 0,5 M), procedendo-se análise de variância e regressão polinomial, para cada explante, em função das concentrações de DMSO e sacarose.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância dos dados de regeneração, número e comprimento de brotos, encontram-se no Tabela 1, observando-se que a interação tripla (explante x dimetilsulfóxido x sacarose), só foi significativa para os dados de comprimento de brotos. Por sua vez, a única interação dupla significativa foi (explante x dimetilsulfóxido), em todas as avaliações realizadas. Já a sacarose foi a única variável que não surtiu qualquer efeito significativo nas avaliações realizadas, indicando que as concentrações desse componente, empregadas no presente estudo não alteram o metabolismo das células. Segundo Dumet *et al.* (1994) os açúcares, como a sacarose, são usados como substâncias





crioprotetoras por se constituírem em ótimos agentes vitrificantes, além de não apresentarem citotoxicidade, mesmo quando acumulados em grande quantidade no citoplasma.

Na Figura 2, encontra-se a regeneração, em porcentagem, dos explantes do pinhão manso diante do pré-cultivo com o crioprotetor químico DMSO. O explante eixo embrionário não sofreu alteração na sua regeneração quando se empregou o DMSO em concentração inferior a 7% no meio MS líquido, apresentando regeneração superior a 98% nessas condições (Figura 2 A e B e Tabelas 2); no entanto, ocorreram reduções na regeneração dos eixos embrionários, com valores na ordem de 63 e 28%, após pré-cultivo, com concentrações de 14 e 20% do DMSO, respectivamente, enquanto o explante eixo com cotiledonares sofreu ainda mais o efeito do DMSO, reduzindo consideravelmente sua regeneração a medida em que foi submetido ao pré-cultivo com o crioprotetor químico (Figura 2 A e B e Tabela 1). O comportamento da regeneração dos explantes após o tratamento com o DMSO demonstra a susceptibilidade dos mesmos às concentrações elevadas daquele crioprotetor, afetando sua viabilidade, sendo portanto, de grande importância o estudo da viabilidade dos explantes após tratamento em menores concentrações. Em comunhão com os resultados obtidos, diversos trabalhos, empregando o cultivo de células vegetais, tem indicado que o ótimo de concentração do DMSO como crioprotetor situa-se entre 5 a 8% (SAKAI e SUGAWARA, 1978) porém padrões de 5 a 15% (KARTHA *et al.*, 1979) parecem refletir as diferentes taxas de penetração do DMSO em ápices de várias espécies.

CONCLUSÃO

O acesso do Garanhuns-PE eixo embrionário e eixos com cotiledonares, do pinhão manso não é afetada pelo emprego da sacarose como crioprotetor nas concentrações estudadas (0,10; 0,25 e 0,50 M);

O pré-cultivo dos eixos e eixos com cotilêdôneos do pinhão manso durante 48 horas em meio MS líquido contendo dimetilsulfóxido, em concentração superior a 7%, afeta a viabilidade dos mesmos, quer isolado ou associado a sacarose nas concentrações estudadas (0,10; 0,25 e 0,50M);

O método de vitrificação dos eixos e eixo com cotilêdôneos do pinhão manso pré-cultivados com sacarose (0; 0,10; 0,25 e 0,50 M) e/ou dimetilsulfóxido (0; 7; 15 e 20%), garantiu regeneração ou qualquer atividade metabólica após imersão direta no nitrogênio líquido (-196°C) e descongelamento sob condições de ambiente (25±2°C por 60 minutos).





REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERJAK, P.; WALKER, M.; MYCOCK, D.J.; WESLEY-SMITH, J.; WATT, P.; PAMMENTER, N.W. Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Japan/International; Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p.140-155.

DUMET, D.; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUSSERT, S.; DUVAL, Y. Effects of various sugars and polyols on the tolerance to desiccation and freezing of oil plum polyembryonic cultures. **Seed Science Research**, v.4, p.307-313, 1994.

KARTHA, K.K. Meristem culture and germplasm preservation. In: KARTHA, K.K. **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1985. p.115-134.

KARTHA, K.K.; LEUNG, N.L.; GAMBORG, O.L. Freeze-preservation of pea meristems in liquid nitrogen and subsequent plant regeneration. **Plant Science Letters**. v.15, p.7-15, 1979.

MURASCHIGE, T.;SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, Copenhagen, n. 15, p. 473-497, 1962.

SILVA, A. F. S. **Pinhão manso: *Jatropha curcas***. Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico CDT/UnB. Disponível em: www.cdt.unb.br. Acessado em: julho de 2007.



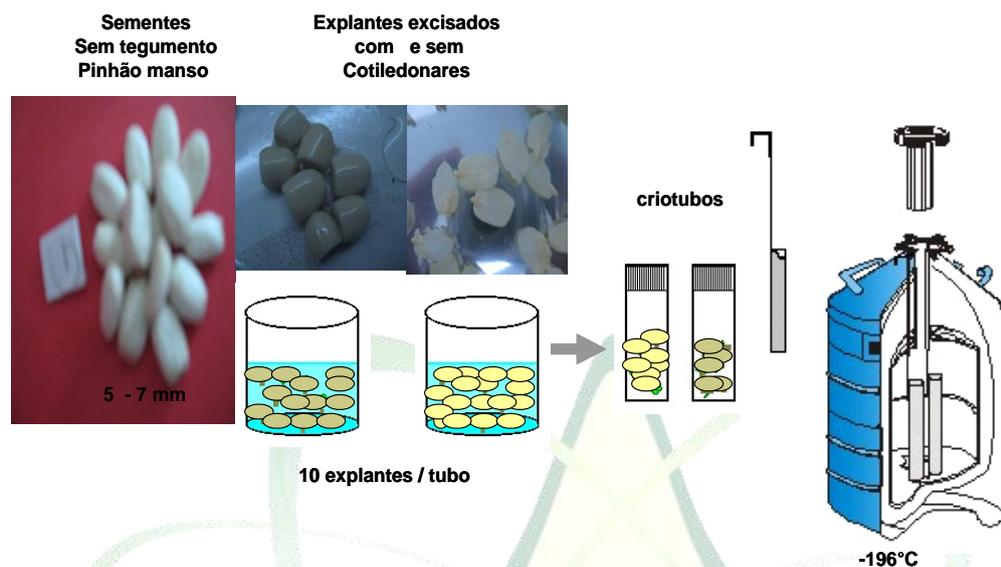


Figura 1. Criopreservação de explantes do pinhão manso pelo método da vitrificação.

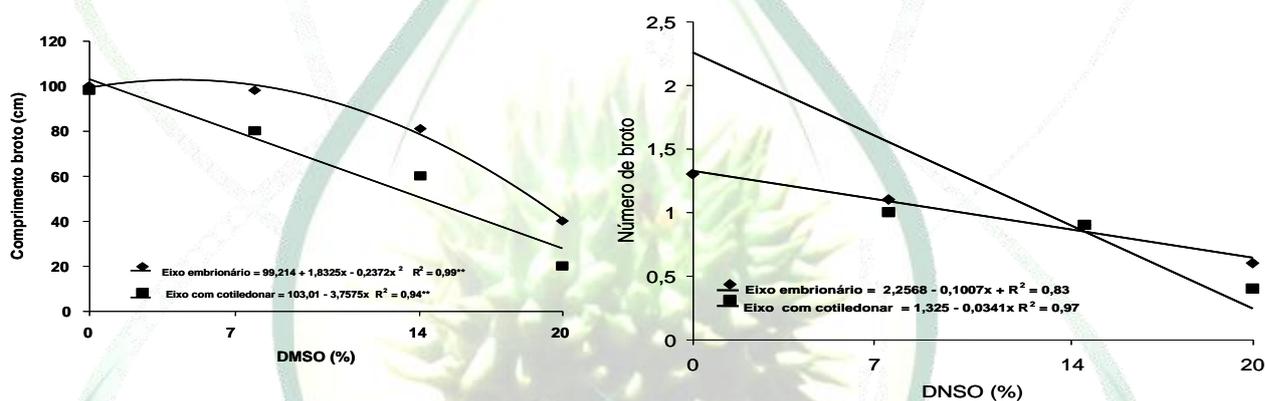


Figura 2. Regeneração (A), número de brotos emitidos (B), de explantes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) cultivados *in vitro*, em função da concentração do dimetilsulfóxido (DMSO), usado como crioprotetor.



Tabela 1 Análise de variância da regeneração, número e comprimento de brotos emitidos por eixos embrionário (*Jatropha curcas* L.), submetidos ao processo da vitrificação.

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Regeneração (%)	Número de brotos	Comprimento de brotos (cm)
Explante (E)	1	6258,01**	0,0348 *	3,1375**
Dimetilsulfóxido (D)	3	38946,03**	5,9549**	3,6213**
Sacarose (S)	3	49,15 ^{ns}	0,0033 ^{ns}	0,0045 ^{ns}
E x D	3	967,38**	1,0469**	0,3503**

D/ E1	(3)			
Efeito linear	1	50000,00**	4,1519**	7,0448**
Efeito quadrático	1	4556,25**	0,7591**	0,9120**
Desvio da regressão	1	945,32**	0,0009 ^{ns}	0,0048 ^{ns}
D/ E2	(3)			
Efeito linear	1	63703,83**	15,2775**	3,7758**
Efeito quadrático	1	244,14**	0,4489**	0,0564 ^{ns}
Desvio da regressão	1	290,70**	0,3672**	0,1209**

E x S	3	17,38 ^{ns}	0,0043 ^{ns}	0,0022 ^{ns}
D x S	9	10,26 ^{ns}	0,0046 ^{ns}	0,0036 ^{ns}
E x D x S	9	10,79 ^{ns}	0,0041 ^{ns}	0,0062**

Resíduo	96	25,84635	0,008749	0,002369
Total	127			

CV (%)		7,74	11,91	7,67

** Significativo a 1% de probabilidade; * Significativo a 5% de probabilidade e ^{ns} Não significativo

