

AVALIAÇÃO DO PROTOCOLO DE VITRIFICAÇÃO NA CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Petiveria alliacea* L.

Jamine A. Pettinelli¹, Mariana Pimenta², Bianka O. Soares¹, Renata de O. Garcia³, Elisabeth Mansur³, Florent Engelmann³, Rachel F. Gagliardi³

Núcleo de Biotecnologia Vegetal – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – Universidade do Estado do Rio de Janeiro: 1. Alunos de Pós-graduação; 2. Aluno de graduação; 3. Pesquisadores.

Estudos biotecnológicos para a produção e conservação in vitro de Guiné (Petiveria alliacea L.) vêm sendo realizados no Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ (IBRAG). Esta planta vem sendo obtida por extrativismo para utilização na medicina popular. Originária da Floresta Amazônica, distribui-se em regiões tropicais das Américas e África. Técnicas de cultura de tecidos são indicadas para a produção e conservação de plantas medicinais não cultivadas por métodos convencionais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sobrevivência e a recuperação de embriões somáticos criopreservados em NL, após o tratamento com sacarose (0,3-0,5-0,7M), seguido por crioproteção com solução de PVS2 (0, 15, 30, 45 ou 60 min). Após o descongelamento rápido, a sobrevivência foi determinada através do teste colorimétrico de TTC e a recuperação dos embriões somáticos foi determinada pela multiplicação, após 90 dias de cultivo em condições padrão de cultura. O pré-tratamento com sacarose causou uma desidratação proporcional às concentrações testadas, e não afetou a sobrevivência. O tratamento com PVS2, por 15 minutos, propiciou uma taxa de 100% de sobrevivência.

Palavras-chave: planta medicinal, Guiné, micropropagação, embriões somáticos, vitrificação.

1. Introdução

Este trabalho representa uma etapa do projeto “Cultura de tecidos, criopreservação e avaliação de efeitos biológicos de extratos de plantas *in vitro* e *ex vitro* de *Petiveria alliacea* L.”, apoiado pelo CETREINA com uma bolsa de Estágio Interno Complementar, e desenvolvido, desde 2007, no Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ (Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes). O projeto visa ao estabelecimento de estratégias biotecnológicas de produção, conservação e monitoramento da qualidade de materiais vegetais de interesse medicinal para fins de conservação de germoplasma e estudos fitoquímicos e toxicológicos. Seu desenvolvimento já possibilitou o treinamento e capacitação de vários alunos graduandos de Ciências Biológicas, para o trabalho em laboratórios de cultura de tecidos vegetais e para o uso da biotecnologia na produção e conservação de germoplasma. O projeto também vêm sendo utilizado, desde 2012, como base para a introdução de conceitos e aplicações da Biotecnologia Vegetal no ensino médio de escolas públicas do Rio de Janeiro, através de projeto de extensão “Produção e conservação *in vitro* de plantas medicinais” cadastrado na UERJ. Além disso, este trabalho está incluído em um projeto de cooperação internacional do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (UERJ), com o “Institut de Recherche pour le Developpement” (França), iniciado em 2013, visando o intercâmbio de alunos e pesquisadores para treinamento em protocolos de criopreservação a serem aplicados em espécies nativas.

A espécie vegetal estudada (*Petiveria alliacea* L.) pertence à família Phytolaccaceae, sendo conhecida no Rio de Janeiro, como Guiné, e seus efeitos biológicos terapêuticos justificam a utilização popular, como analgésico e anti-inflamatório. Entretanto, a planta possui também efeitos citotóxicos demonstrados por importante atividade antineoplásica (RUFFA *et al.*, 2002), além de

efeitos neurotóxicos, como convulsões graduais, seguidas por apatia e paralisia que podem levar à morte (CAMARGO, 2007). Os efeitos neurológicos são conhecidos desde o período colonial, quando os escravos misturavam as raízes pulverizadas ao alimento dos senhores em retaliação aos castigos recebidos (LORENZI e MATOS, 2002). Portanto, a erva é usada até hoje, em rituais afro-brasileiros com objetivo de “acalmar as bruxas” (CAMARGO, 2007). O projeto vem sendo desenvolvido através de diferentes etapas metodológicas, com o estabelecimento da cultura de tecidos (CASTELLAR et al. 2011; CANTELMO *et al.*, 2013), além da caracterização taxonômica (SOARES *et al.* 2013), da avaliação fitoquímica (CASTELLAR *et al.*, 2013) e genotóxica (SOARES *et al.*, 2014) de plantas de campo e plantas produzidas *in vitro*. A criopreservação vem sendo estudada na etapa correspondente a este trabalho, visando à conservação em longo prazo do material obtido biotecnologicamente.

A obtenção de material botânico por extrativismo, para utilização medicinal, é uma das causas de erosão genética, justificando a produção e a conservação *in vitro* de espécies medicinais, como *P. alliacea*, estudada neste trabalho. Nas etapas anteriores, a cultura de tecidos foi estabelecida, através de multiplicação de meristemas pré-existentes (CASTELLAR *et al.*, 2011) e embriogênese somática (CANTELMO *et al.*, 2013), que possibilitaram a micropropagação, com a produção de clones *in vitro*. Entretanto, em função da possibilidade de ocorrerem alterações nas plantas mantidas em condições de cultura de tecidos (SCOWCROFT, 1984), este método não é indicado para a conservação por longos períodos de tempo. Por outro lado, a literatura mostra que plantas medicinais conservadas em nitrogênio líquido retêm o potencial regenerativo e biossintético por tempo indeterminado (AHUJA *et al.*, 2002; TRIPATHI e TRIPHATI, 2003; DIXTI-SHARMA *et al.*, 2005).

Durante o desenvolvimento do projeto, os resultados preliminares demonstraram a viabilidade de um protocolo de criopreservação através da vitrificação protetora dos embriões somáticos, após a desidratação com sacarose e tratamento com solução PVS2 (PETTINELLI *et al.*, 2012). A alta viscosidade dos componentes desta solução promove a formação de um sólido amorfo (vítreo) nas células dos tecidos vegetais usados como explantes, impedindo a formação de cristais de gelo (SAKAI *et al.*, 1990). O objetivo desta etapa foi avaliar a sobrevivência e a recuperação de embriões somáticos pré-tratados com sacarose e PVS2, após a criopreservação em nitrogênio líquido.

2. Metodologia

Embriões somáticos oriundos de explantes foliares cultivados em meio MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962) suplementado com Picloram (5mg/l) (CANTELMO *et al.*, 2013), foram isolados e tratados com diferentes concentrações de sacarose (0,3-0,5-0,7M). Em seguida, esse material foi imerso em solução crioprotetora PVS2 (sacarose 0,4M, glicerol 30%, etileno glicol 15% e DMSO 15%) (SAKAI *et al.*, 1990), assim permanecendo por diferentes períodos de tempo (0, 15, 30, 45 ou 60 minutos) e, a seguir imerso em nitrogênio líquido por 24h. A avaliação do teor hídrico foi feita através da relação entre peso fresco e seco, após cada pré-tratamento. A sobrevivência foi avaliada pelo teste colorimétrico do TTC (MIKULA *et al.*, 2006) e a recuperação foi determinada pela capacidade de multiplicação embriogênica, após 90 dias de cultura em câmara de crescimento (30°C±2°C, sob intensidade luminosa de 46 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16h).

3. Resultados

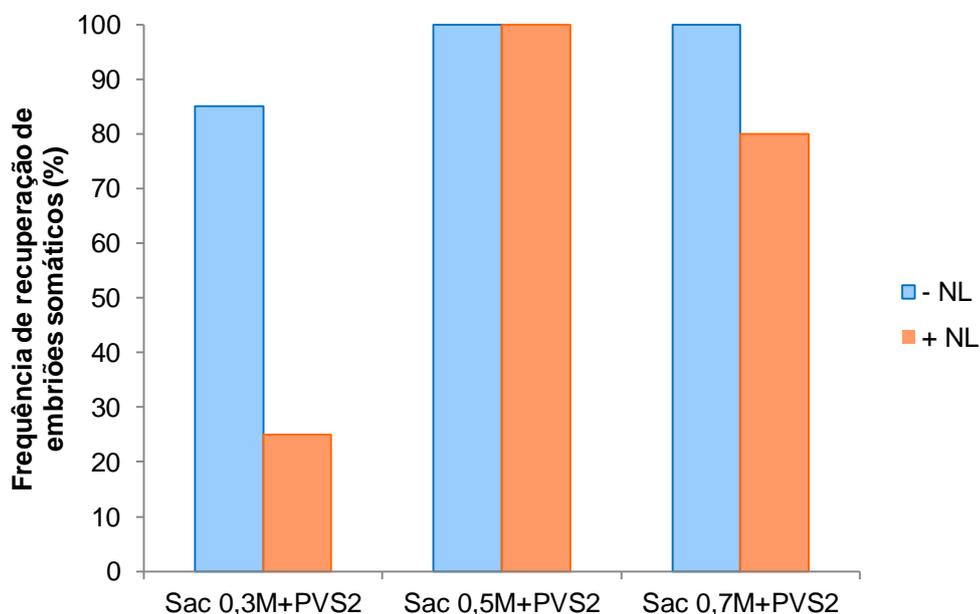
O pré-tratamento com sacarose causou uma desidratação proporcional às concentrações testadas, e, com base no teste do TTC, não afetou a sobrevivência logo após o descongelamento, que se manteve em 100% independentemente do teor hídrico obtido (Tabela 1). Na avaliação da influência do tempo de exposição ao PVS2, a exposição por 15 minutos, propiciou uma taxa de 100% de recuperação, dos embriões somáticos tratados (Gráfico 1). Embriões expostos por tempos

maiores não sobreviveram aos tratamentos, provavelmente devido à toxidez do DMSO, presente na composição do PVS2.

Tabela 1. Efeito da pré-cultura com diferentes concentrações de sacarose no teor hídrico de embriões somáticos de *Petiveria alliacea*

Concentração de Sacarose (M)	Teor hídrico (%)	Sobrevivência pelo TTC (%)
0	98,7 ± 3,4	100
0,3	82,6 ± 6,9	100
0,5	76,0 ± 7,5	100
0,7	71,6 ± 9,8	100

Gráfico 1. Recuperação de embriões somáticos de *Petiveria alliacea* tratados com sacarose e PVS2, aos 90 dias de cultivo após a criopreservação



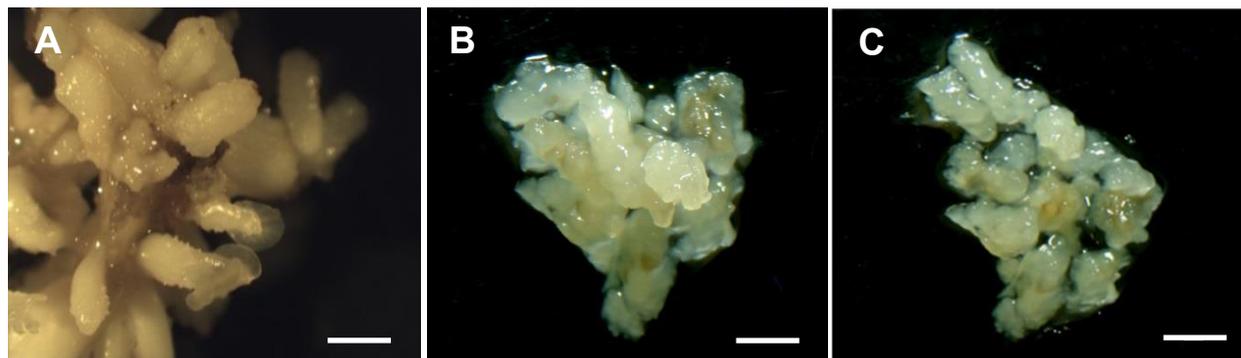


Figura 1. Embriões somáticos (ES) de *Petiveria alliacea*. A - ES oriundos de folhas mantidas em PIC (5mg/ml), após 60 dias. B - ES desidratados por 24 h em sacarose 0,5M e tratados com PVS2 por 15 min. C - ES desidratados como em (B) e imersos em nitrogênio líquido por 24 h. Barra = 1cm.

4. Conclusões

Na técnica de vitrificação, a combinação de 0,5M de sacarose com o tempo de exposição de 15 minutos ao PVS2 forneceu a maior taxa de recuperação (100%) de embriões somáticos, após a retirada do NL. Assim, o protocolo desenvolvido pode ser indicado para a conservação em longo prazo dos recursos genéticos de *Petiveria alliacea* L.

5. Agradecimentos:

Este trabalho recebeu apoio financeiro da FAPERJ, do CNPq e da CAPES.

6. Referências bibliográficas:

AHUJA S., MANDAL B.B., DIXIT S., SRIVASTAVA P.S. Molecular, phenotypic and biosynthetic stability in *Dioscorea floribunda* plants derived from cryopreserved shoot tips. **Plant Science**, v.163, p. 971-977, 2002.

CAMARGO, M.T.L.A. Contribuição etnofarmacobotânica ao estudo de *Petiveria alliacea* L. – Phytolacaceae – (“amansa-senhor”) e a atividade hipoglicemiante relacionada a transtornos mentais. **Dominguezia**, v.23, n^o 1, p.21-27, 2007.

CANTELMO, L.; SOARES, B.O.; PETTINELLI, J.A.; CALLADO, C.H.; MANSUR, E.; CASTELLAR, A.; GAGLIARDI, R.F. Repetitive somatic embryogenesis from leaves of the medicinal plant *Petiveria alliacea* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.115, p. 385 – 393, 2013.

CASTELLAR, A., GAGLIARDI, R F, MANSUR, E. In vitro propagation and establishment of callus and cell suspension cultures of *Petiveria alliacea* L., a valuable medicinal plant. **Journal of Medicinal Plant Research**, v.5, p.1113 - 1120, 2011.

CASTELLAR, A.; GAGLIARDI, R.F.; MANSUR, E.; BIZZO, H.; SOUZA, A.M.; LEITÃO, S.G. Volatile constituents from *in vitro* and *ex vitro* plants of *Petiveria alliacea* L. **Journal of Essential Oil Research**, v. 26, n^o1, p. 1-5, 2013.

DIXTI-SHARMA S., AHUJA-GHOSH S., MANDAL, B.B., SRIVASTAVA P.S. Metabolic stability of plants regenerated from cryopreserved shoot tips of *Dioscorea deltoidea* – an endangered medicinal plant. **Scientia Horticulturae**, v.105, p. 513-517, 2005.

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

MURASHIGE T, SKOOG F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497, 1962.

PETTINELLI, J.A.; SOARES, B.O.; CANTELMO, L.; PIMENTA, M.; COCHOFEL, J.; GARCIA, R.O.; MANSUR, E.; GAGLIARDI R.F. Evaluation of the survival of somatic embryos of *Petiveria alliacea* L. cryopreserved after different pretreatments with sucrose and PVS2. **Cryobiology**, v. 65 (Abstracts), p. 363, 2012.

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

SOARES B.O.; FERNANDES D.C.; CANTELMO L.; ROCHA L.P.; PETTINELLI J.A.; CHRISTO A.G.; COELHO M.G.P.; GAGLIARDI, R.F. Botanical characterization of *Petiveria alliacea* L. from Rio de Janeiro, Brazil: systematic and functional implications. **Plant Biosystems**, v. 147, n^o 2, p. 411–417, 2013.

SOARES, B. O.; OLIVEIRA, M.B.N ; MANSUR, E; DANTAS, F.J.S. ; DE-MATTOS, J.C.P.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; GAGLIARDI, R.F. Effect of extracts from field and *in vitro* plants of *Petiveria alliacea* L. on plasmidial DNA. **Journal of Medicinal Plant Research**, v.8, n^o 35, p. 1101-1109, 2014.

TRIPATHI L, TRIPATHI JN. Role of biotechnology in medicinal plants. **Tropical Journal Pharmaceutical Research**, v.2, p. 243-253, 2003.

SCOWCROFT, W.R. Genetic variability in tissue culture: impact on germplasm conservation and utilization. Technical Report. IBPGR. Rome, 1984.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. 2002. Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, Plantarum.

RUFFA M.J., FERRARO G., WAGNER M.L., CALCAGNO M.L., CAMPOS R.H., CAVALLARO L. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, p. 335–339, 2002.

A CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES
SOMÁTICOS INDUZIDOS NA CULTURA DE
TECIDOS CONSTITUI FERRAMENTA
IMPORTANTE PARA A CONSERVAÇÃO DE
RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS