

CIRCULAR TÉCNICA

n. 217 - junho - 2015

ISSN 0103-4413



Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
Departamento de Informação Tecnológica

Av. José Cândido da Silveira, 1.647 - União - 31170-495
Belo Horizonte - MG - site: www.epamig.br - Tel. (31) 3489-5000



Teste do teor de umidade de sementes sintéticas da bananeira Prata-Anã clone Gorutuba submetidas a diferentes tempos de desidratação em câmara de fluxo contínuo¹

*Luciana Nogueira Londe²
Nayara de Souza Damascena³
Francielle de Matos Feitosa⁴
Selma Silva Rocha⁵
Flávio Henrique Silva de Sena⁶
Emerson Brito Ribeiro⁷*

INTRODUÇÃO

O grande desafio para os protocolos de criopreservação é realizar um congelamento, em nitrogênio líquido (-196°C), sem a formação de cristais de gelo no interior das células. Estes cristais são formados pela alta concentração de água existente na amostra, mesmo após serem submetidos aos tratamentos. Vale ressaltar que, quando a água é removida das células, solutos podem-se tornar mais concentrados, aumentando a taxa de reações químicas destrutivas. Alguns solutos podem cristalizar-se, mudando o potencial iônico e o pH da solução intracelular, alterando, assim, o status metabólico da célula (KRAMER; BOYER, 1995).

A etapa de desidratação é a mais crítica do processo de criopreservação, já que a água precisa ser removida antes do congelamento para um teor de umidade que seja baixo o suficiente para evitar a injúria causada pelos cristais de gelo, mas não tão

reduzidos a ponto de causar injúria por desidratação.

Alguns autores obtiveram sucesso com a técnica de encapsulamento-desidratação em outras culturas, como Jekkel et al. (1998) e Martínez, Tamés e Revilla (1999), os quais indicaram que o teor de água ideal observado para a sobrevivência dos explantes à exposição do nitrogênio líquido varia entre 15% e 25%.

Já Wang et al. (2000), ao trabalharem com ápices caulinares de videiras encapsuladas e expostas a diferentes tempos de desidratação, constataram a sobrevivência do material apenas quando esses ápices atingiram teores de 22,5%.

Para Abdelnour-Esquivel, Mora e Villalobos-Arambula (1992), é recomendável ter uma estimativa do tempo necessário para obter teor de água de cerca de 14% (% de peso fresco), considerado como conteúdo de água ideal, resultando em maior recuperação pós-descongelamento.

¹Circular Técnica produzida pela EPAMIG Norte de Minas, (38) 3834-1760, ctnm@epamig.br

²Bióloga, D.Sc., Pesq. EPAMIG Norte de Minas/Bolsista FAPEMIG, Nova Porteirinha, MG, luciana@epamig.br

³Graduanda Agronomia UNIMONTES, Bolsista FAPEMIG/EPAMIG Norte de Minas, Nova Porteirinha, MG, nayasouza22@gmail.com

⁴Graduanda Agronomia UNIMONTES, Estagiária EPAMIG Norte de Minas, Nova Porteirinha, MG, franciellefeitosa@hotmail.com

⁵Graduanda Agronomia UNIMONTES, Bolsista FAPEMIG/EPAMIG Norte de Minas, Nova Porteirinha, MG, selmauniagro@hotmail.com

⁶Graduando Agronomia UNIMONTES, Estagiário EPAMIG Norte de Minas, Nova Porteirinha, MG, flaviohenriquesena@yahoo.com.br

⁷Téc. Química, EPAMIG Norte de Minas, Nova Porteirinha, MG, britorib@hotmail.com

Segundo Panis (2009), a desidratação torna-se ainda mais difícil de controlar para espécies de clima tropical, como, por exemplo, as do gênero *Musa*, visto que tais espécies apresentam alta sensibilidade à dessecação e ao congelamento. Por isso, é necessário adaptar um protocolo em relação a sua resistência ao congelamento.

O objetivo com este experimento foi identificar o tempo ideal de desidratação das sementes em câmara de fluxo contínuo, para uma umidade que garanta o armazenamento das sementes sintéticas da bananeira Prata-Anã clone Gorutuba em nitrogênio líquido.

DESIDRATAÇÃO DE SEMENTES EM CÂMARA DE FLUXO CONTÍNUO

Este experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia da EPAMIG Norte de Minas, situada em Nova Porteirinha, MG. Microbrotos de bananeira cultivados in vitro foram encapsulados em matriz de alginato de sódio. Essa matriz, por sua vez, foi composta por 3% alginato de sódio e 2 M de glicérol, formulação salina MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), os quais tiveram o pH ajustado para 5,8 antes da gelificação; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (100 mM) e KNO_3 (100 mM); autoclavados a 121 °C e 1,5 atm por 20 minutos para esterilização.

Os microbrotos foram mergulhados à matriz de alginato de sódio e retirados com o auxílio de uma pipeta automática ajustada para 700 μL . Na sequência, as unidades encapsuláveis foram gotejadas em solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (100 mM), na qual permaneceram por 20 minutos para complexação. As sementes sintéticas, individualmente formadas, foram submetidas à tríplice lavagem em água destilada e esterilizada e, logo em seguida, imersas em solução de KNO_3 (100 mM) por 15 minutos para a descomplexação, sendo, na sequência, novamente lavadas em água destilada esterilizada.

Utilizou-se uma parcela com 15 sementes sintéticas, que foram colocadas em placa de Petri e expostas ao fluxo contínuo da câmara. Para a desidratação destas, foram testados diferentes tempos de exposição (0h; 2h; 4h; 6h; e 8 h).

Para acompanhar a curva de perda de água das sementes sintéticas, todas as cápsulas foram pesadas antes e após cada tempo de tratamento. O peso inicial foi determinado a partir do peso das sementes mais a tara.

Após os tratamentos, os dados foram submetidos aos cálculos da perda de umidade, a saber:

$$\% \text{ Umidade} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial} - \text{Tara}}$$

AValiação DOS TEMPOS DE DESIDRATAÇÃO

Os tempos de desidratação 0h, 2h, 4h, 6h e 8h em câmara de fluxo laminar obtiveram 0%; 18,92%; 34,98%; 49,26% e 55,78% de umidade perdida, respectivamente (Gráfico 1).

Steinmacher (2005), ao trabalhar com cápsulas de embriões zigóticos de pupunha, obteve bons resultados após 4 horas de desidratação, quando então as cápsulas apresentaram entre 17%-20% de teor de água, ao contrário dos resultados observados neste experimento, que obteve, em banana Prata-Anã clone Gorutuba, por um período de 4 horas, 34,98% de umidade perdida, ou seja, 65,02% de umidade da cápsula (Gráfico 1).

Os aspectos físicos foram afetados com o decorrer do tempo. Observou-se aumento da oxidação conforme o passar das horas. Níveis visíveis de oxidação começaram a ser vistos a partir das 3 horas de desidratação, com desidratação expressiva já sendo notada com 4 horas, obtendo nível mais alto às 8 horas de desidratação (Fig. 1).

Neste trabalho não foi possível obter o ponto de equilíbrio de umidade ideal para as sementes serem submetidas ao nitrogênio líquido (-196°C) já que, após o período de 4 horas de desidratação, as sementes apresentavam aspecto de oxidação, possivelmente pela desidratação excessiva. Esse fato pode ser comprovado por Panis et al. (2002) que, trabalhando com criopreservação direta de meristemas de *Musa acuminata* e *Musa balbisiana*, demonstraram alta regeneração de sementes quando estas atingi-

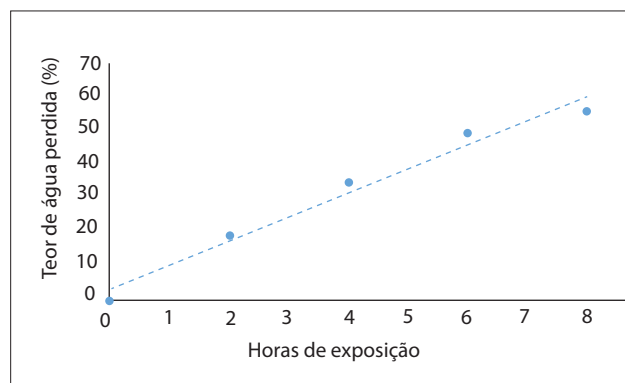


Gráfico 1 - Curva de perda de água em diferentes intervalos de tempo de microbrotos encapsulados da bananeira Prata-Anã clone Gorutuba



Fotos: Nayara de Souza Damascena

Figura 1 - Aspecto físico dos microbrotos de bananeira Prata-Anã clone Gorutuba após desidratação ao ar em câmara de fluxo contínuo

NOTA: A - Início da oxidação (seta) das sementes sintéticas sendo observada a partir das 3 horas de desidratação; B - Oxidação (seta) das sementes sintéticas sendo observada com 4 horas de desidratação; C - Oxidação excessiva (seta) das sementes sintéticas com 8 horas de desidratação.

ram 14% de umidade, alcançada após 1h30min e 2h de desidratação, respectivamente. Neste trabalho, ao invés de meristemas, foram utilizadas sementes encapsuladas de banana Prata-Anã clone Gorutuba, e com 2 horas de desidratação, as sementes apresentavam 18,92% de umidade perdida, ou seja, 81,08% de umidade.

CONSIDERAÇÃO FINAL

O tempo de 4 a 8 horas ocasionou desidratação de semente sintética de bananeira Prata-Anã clone Gorutuba, visto que esta cultura é sensível à desidratação.

REFERÊNCIAS

ABDELNOUR-ESQUIVEL, A.; MORA, A.; VILLALOBOS-ARAMBULA, V.M. Cryopreservation of zygotic embryos of *Musa acuminata* (AA) and *M. balbisiana* (BB). **Cryo Letters**, v.13, n.3, p.159-164, 1992.

JEKKEL, Z. et al. Cryopreservation of horse-chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) somatic embryos using three different freezing methods. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, v.52, n.3, p.193-197, 1998.

KRAMER, P.J.; BOYER, J.S. **Water relations of plants and soils**. San Diego: Academic Press, 1995.

MARTÍNEZ, D.; TAMÉS, R. S.; REVILLA, M. A. Cryopreservation of in vitro-grow shoot-tips of hop (*Humulus lupulus* L.) using encapsulation/dehydration. **Plant Cell Reports**, v.19, p.59-63, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

PANIS, B. **Cryopreservation of Musa germplasm**. 2nd ed. Montpellier: Bioversity International, 2009. (Technical Guidelines, 9).

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

STEINMACHER, D.A. **Germinação in vitro, criopreservação e embriogênese somática de pupunha**. 2005. 146p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

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