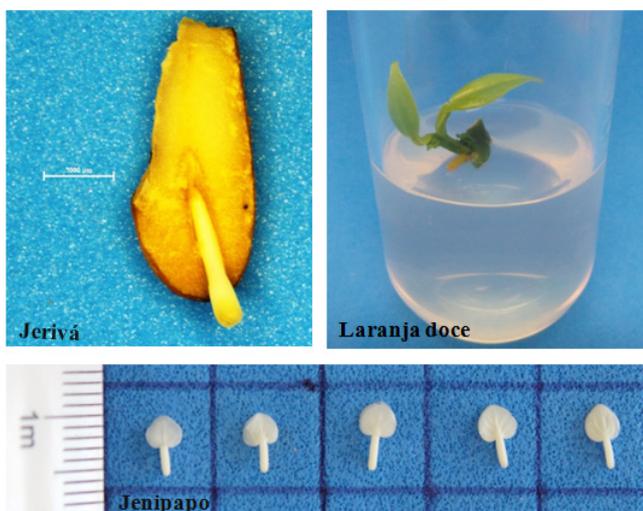


Fotos: Antonieta N. Salomão e Izulmé R. I. Santos



## Critérios para a Avaliação de Germoplasma Vegetal após Congelamento em Nitrogênio Líquido

Izulmé Rita Imaculada Santos<sup>1</sup>  
Antonieta Nassif Salomão<sup>2</sup>  
Solange Carvalho Barrios Roveri José<sup>3</sup>  
Rosangela Caldas Mundim<sup>4</sup>

### Introdução

Os procedimentos requeridos para o manejo de coleções de germoplasma em bancos de sementes estão estabelecidos para um grande número de espécies. Os padrões para a conservação de germoplasma semente são praticamente os mesmos para sementes ortodoxas, com pequenos ajustes de acordo com a espécie botânica ou o genótipo. As etapas adotadas em bancos convencionais de germoplasma sementes são beneficiamento, determinação do teor de água, secagem, avaliação da qualidade do material e armazenamento em temperaturas subzero que variam de -18 a -20°C (FAO, 2013; HAY; PROBERT, 2013).

Os protocolos de criopreservação existentes para várias espécies são mais elaborados e trabalhosos, pois estão estabelecidos de acordo com a espécie e/ou a estrutura a ser conservada

(REED, 2008). Atualmente, as técnicas disponíveis para a criopreservação de estruturas vegetativas e reprodutivas são imersão direta em nitrogênio líquido; vitrificação; encapsulamento-vitrificação; vitrificação-encapsulamento-vitrificação; pré-cultivo; pré-cultivo-vitrificação; gota-vitrificação; e “cryo-plates” (ENGELMANN; GONZÁLEZ-ARNAO, 2013).

Uma das etapas essenciais dos protocolos, em função da técnica adotada e da estrutura vegetal a ser criopreservada, é a avaliação de sobrevivência e integridade estrutural do material após seu armazenamento em nitrogênio líquido.

Assim sendo, devido à diversidade de espécies utilizadas em práticas rotineiras do Laboratório de Criobiologia Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, foram estabelecidos critérios para definir os conceitos de sobrevivência e integridade estrutural, bem como aprimorar,

<sup>1</sup> *Bióloga, Ph.D., Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.*

<sup>2</sup> *Engenheira Florestal, MsC, Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.*

<sup>3</sup> *Engenheira-agrônoma, Ph.D., Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.*

<sup>4</sup> *Bacharel, Técnica da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.*

adequar ou desenvolver as etapas dos protocolos de criopreservação. Dentre os critérios estabelecidos, estão aqueles que são utilizados não só para avaliar a regeneração dos explantes após o congelamento, como também para avaliar o desenvolvimento e a capacidade de multiplicação do germoplasma.

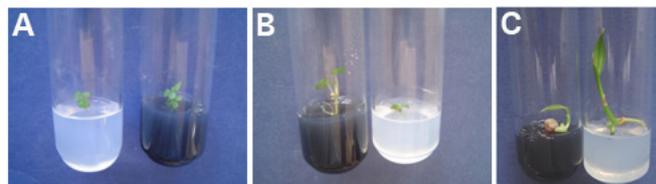
## Critérios

### Primeiro critério

Identifica em que meio de cultura a regeneração do explante é mais robusta. Para espécies autóctones, monocotiledôneas e dicotiledôneas, geralmente são testados os meios de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e WPM acrescido de carvão vegetal (LLOYD; MCCOWN, 1981) (Tabela 1). A maioria das espécies apresenta regeneração mais robusta em meio de cultura WPM acrescido de carvão ativado (Figura 1A, B, C).

**Tabela 1.** Composição dos meios de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981).

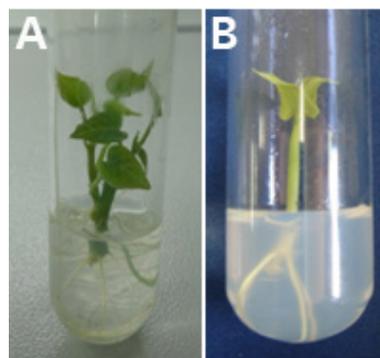
Reagente	Formulação	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	
		MS	WPM
Macronutrientes			
Nitrato de amônio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,650	20
Nitrato de cálcio	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	-	27,8
Nitrato de potássio	KNO <sub>3</sub>	1,900	-
Sulfato de potássio	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,170	49,5
Cloreto de cálcio	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,44	19,2
Sulfato de magnésio	MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,37	74,0
Fosfato de potássio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	34,0
Micronutrientes			
Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0062	1,24
Molibdato de sódio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,00025	0,05
Sulfato de manganês	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,0169	4,46
Sulfato de zinco	ZnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,0086	1,72
Sulfato de cobre	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,00025	0,05
Iodeto de potássio	KI	0,00083	-
Cloreto de cobalto	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,000025	-
FeEDTA			
Sulfato de ferro	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0278	5,57
Na <sub>2</sub> -EDTA		0,0373	7,45
Vitaminas e aminoácidos			
Ácido nicótico		0,0005	0,1
Tiamina-HCL		0,0001	0,2
Piridoxina-HCL		0,0005	0,1
Glicina		0,002	0,4
L-cisteína		100	-
Outros componentes			
Mio-inositol		0,1	20,0
Sacarose		30	20,0
Ágar		8	6,0
Carvão ativado		3	-



**Figura 1.** Germinação de sementes de A: *Clethra scabra* (Clethraceae), B: *Dorstenia tenuis* (Moraceae) e eixos embrionários de C: *Butia eriostatha* (Arecaceae), em meios de cultura MS e WPM acrescido de carvão ativado.

### Segundo critério

Considera como sobreviventes ao congelamento apenas os explantes que apresentam formação de partes aérea e radicular, estruturas essenciais às plantas normais (Figura 2A, B). Estruturas amorfas, ainda que clorofiladas e friáveis, como calo de batata-doce (Figura 3), não são consideradas como sobreviventes ao nitrogênio líquido.



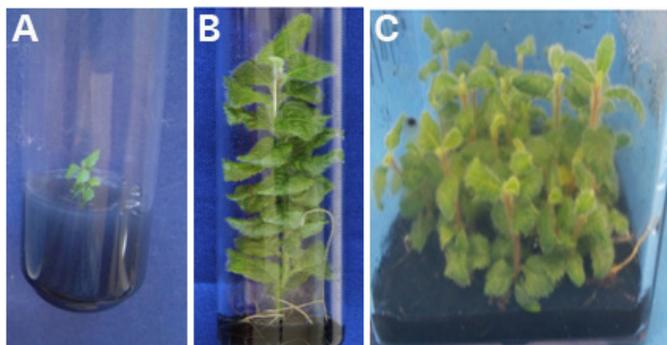
**Figura 2.** Plântulas normais de A: *Ipomoea batatas* (Convolvulaceae) e B: *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) desenvolvidas em meio de cultura.



**Figura 3.** Calo de *Ipomoea batatas* (Convolvulaceae) desenvolvido a partir de explante criopreservado.

### Terceiro critério

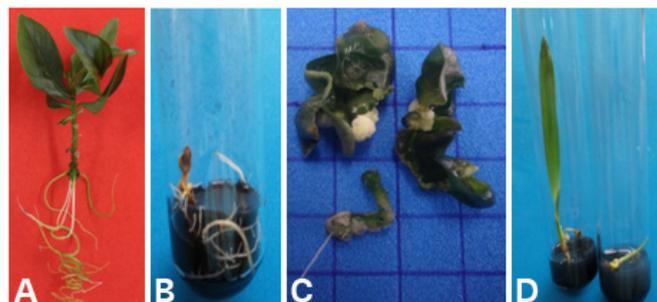
Identifica as melhores condições tanto para a regeneração (Figura 4A) quanto para o desenvolvimento de plantas normais (Figura 4B) e a multiplicação destas (Figura 4C). Graças à multiplicação, é possível dispor de material de qualidade e em quantidade para testes com estruturas vegetativas.



**Figura 4.** Regeneração (A), desenvolvimento de plântula normal (B) e multiplicação (C) de *Clethra scabra* (Clethraceae).

### Quarto critério

Diferencia o tipo de dano sofrido pelo explante por meio da anormalidade apresentada, assim como a desuniformidade de desenvolvimento de plantas normais. Na avaliação, explantes que apresentam anormalidades estruturais não são considerados sobreviventes; porém, plantas normais com desenvolvimento assincrônico são consideradas como explantes sobreviventes, uma vez que esta característica é comum às espécies não domesticadas. Como exemplo do quarto critério, a Figura 5A mostra uma plântula normal de *Genipa americana* (Rubiaceae). A Figura 5B mostra o desenvolvimento anormal da parte aérea em *G. americana* devido a danos de congelamento; na Figura 5C, a anormalidade apresentada é decorrente de danos de desidratação. Os dois explantes de *Syagrus romanzoffiana* (Arecaceae) são considerados como sobreviventes, embora tenham desenvolvimento assincrônico (Figura 5D).



**Figura 5.** A: Plântula normal de *Genipa americana* (Rubiaceae); B: plântula anormal de *G. americana* com dano estrutural devido ao congelamento; C: plântula anormal de *G. americana* com dano estrutural devido à desidratação; D: plântulas normais de *Syagrus romanzoffiana* (Arecaceae) com desenvolvimento assincrônico.

### Quinto critério

Identifica as melhores metodologias para o desenvolvimento de estruturas vegetativas e reprodutivas de uma mesma espécie, como vitrificação e encapsulamento-desidratação ou imersão direta em nitrogênio líquido. Como exemplo, tem-se a utilização das técnicas de vitrificação e encapsulamento-desidratação para a estrutura vegetativa de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) (Figura 6A) e o desenvolvimento de plântula a partir desta estrutura (Figura 6B). Para outras espécies de plantas, como *Arachis magna* (Fabaceae), adotou-se a técnica de imersão direta em nitrogênio líquido de sementes inteiras e o desenvolvimento de plântulas a partir de sementes (Figura 7A) ou de eixos embrionários excisados (Figura 7B) destas.



**Figura 6.** A: Explante encapsulado de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae); B: plântula desenvolvida a partir deste explante.



Figura 7. Plântulas de *Arachis magna* (Fabaceae) desenvolvida a partir de semente inteira (A) e de eixo embrionário (B).

micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, v. 30, p. 421-427, 1981.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

REED, B. M. Cryopreservation: practical considerations. In: REED, B. M. (ed.) **Plant cryopreservation: a practical guide**. USDA-ARS: Springer Science + Business Media, LLC. p. 3-14, 2008.

## Sexto critério

Estabelece como percentual mínimo aceitável de regeneração e desenvolvimento o valor de 50%, independentemente da técnica e do material utilizados para a criopreservação.

## Conclusões

Tais procedimentos têm assegurado maior precisão e repetibilidade às atividades rotineiras do Laboratório.

## Referências

ENGELMANN, F.; GONZÁLEZ-ARNAO, M. T. Introducción a la conservación ex situ de los recursos genéticos vegetales. In: González-Arnao, M. T.; Engelmann, F. (ed). **Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe**. San José: IICA, p. 25-32, 2013.

FAO. **Draft genebank standards for plant genetic resources for food and agriculture**. Disponível em: <http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/seeds-pgr/conservation/gbs/en/>. Acesso em: 21 agosto 2015.

HAY, F. R.; PROBERT, R. J. Advances in seed conservation of wild plant species: a review of recent research. **Conservation Physiology**, v. 1, p. 11, 2013.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible

### Comunicado Técnico 199

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**  
**Endereço:** Parque Estação Biológica (PqEB) - Avenida W5 Norte - Caixa Postal 02372 - Brasília, DF, Brasil  
CEP: 70770-900  
**Fone:** (61) 3448-4700  
**Fax:** (61) 3340-3624  
**E-mail:** sac@cenargen.embrapa.br  
1ª edição  
Publicação *online* (2015)

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento



### Comitê Local de Publicações

**Presidente:** Maria Isabela Lourenço Barbirato  
**Secretário-Executivo:** Thales Lima Rocha  
**Membros:** Daniela Aguiar de Souza Kols, Lígia Sardinha Fortes, Lucas Machado de Souza, Márcio Martinello Sanches, Rosamares Rocha Galvão  
**Membros suplentes:** Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes, João Batista Tavares da Silva

### Expediente

**Normalização bibliográfica:** Ana Flávia do N. Dias Côrtes  
**Revisão de texto:** José Cesamildo Cruz Magalhães  
**Tratamento das ilustrações:** José Cesamildo Cruz Magalhães  
**Editoração eletrônica:** José Cesamildo Cruz Magalhães