

**Adaptação de metodologia para
criopreservação de esporos de
Fungos Micorrízicos Arbusculares**



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
104**

Adaptação de metodologia para
criopreservação de esporos de
Fungos Micorrízicos Arbusculares

*Flávia Louzeiro de Aguiar Santiago
Marisangela Viana Barbosa
Marco Aurélio Carbone Carneiro
Orivaldo José Saggin Júnior*

**Embrapa Agrobiologia
Seropédica, RJ
2020**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia

Rodovia BR 465, km 7
CEP 23891-000, Seropédica, RJ
Caixa Postal 74.505
Fone: (21) 3441-1500
Fax: (21) 2682-1230
www.embrapa.br/agrobiologia
www.embrapa.br/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Agrobiologia

Presidente
Bruno José Rodrigues Alves

Secretária-Executiva
Carmelita do Espírito Santo

Membros
*Ednaldo Silva de Araújo, Janaina Ribeiro Costa
Rouws, Luc Felicianus Marie Rouws, Luis
Cláudio Marques de Oliveira, Luiz Fernando
Duarte de Moraes, Marcia Reed Rodrigues
Coelho, Maria Elizabeth Fernandes Correia,
Nátia Élen Auras*

Supervisão editorial
Maria Elizabeth Fernandes Correia

Normalização bibliográfica
Carmelita do Espírito Santo CRB 7/5043

Tratamento das ilustrações
Maria Christine Saraiva Barbosa

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Maria Christine Saraiva Barbosa

Foto da capa
Orivaldo José Saggin Júnior

1ª edição
1ª impressão: (2020): Edição eletrônica

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agrobiologia

-
- A221 ADAPTAÇÃO de metodologia para criopreservação de esporos de fungos micorrízicos arbusculares./ Flávia Louzeiro de Aguiar Santiago *et al.* Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2020. 17 p. (Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 104). ISSN: 1676-6709.
1. Congelamento. 2. Coleção biológica. 3. Preservação de germoplasma. 4. Glomeromycota. 5. Crioprotetores. I. Santiago, Flávia Louzeiro de Aguiar. II. Barbosa, Marisangela Viana. III. Carneiro, Marco Aurélio Carbone Carneiro. IV. Saggin Júnior, Orivaldo José. V. Embrapa Agrobiologia. VI. Série.

631.46 - CDD 23. ed.

Sumário

Resumo	7
Abstract	8
Introdução.....	9
Material e Métodos	11
Resultados e Discussão	12
Conclusão.....	15
Referências bibliográficas	16

Adaptação de metodologia para criopreservação de esporos de Fungos Micorrízicos Arbusculares

Flávia Louzeiro de Aguiar Santiago¹

Marisangela Viana Barbosa²

Marco Aurélio Carbone Carneiro³

Orivaldo José Saggin Júnior⁴

Resumo – Nas coleções de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) a criopreservação é restrita, pois devido ao grande tamanho e conteúdo líquido dos esporos, eles são mortos pelo congelamento. Poucos estudos mostram sucesso na criopreservação de FMAs, utilizando condições bastante caras e inacessíveis à maioria das coleções. O objetivo desse estudo foi avaliar adaptações aos protocolos de criopreservação, para utilização nas condições e equipamentos disponíveis na maioria das instituições de pesquisa nacionais. Foi testado o efeito do encapsulamento em alginato de sódio sobre a germinação dos esporos de quatro espécies de FMAs (*Rhizophagus clarus*, *Dentiscutata heterogama*; *Acaulospora morrowiae* e *Gigaspora margarita*) e, com a espécie que apresentou maior taxa de germinação, foram testados diferentes crioprotetores e o armazenamento a -80°C. O encapsulamento dos esporos dentro de pérolas de alginato promoveu a redução na taxa de germinação, mas não foi limitante para impedir a germinação das quatro espécies. O encapsulamento foi essencial para conseguir a germinação de *Dentiscutata heterogama* após o congelamento a -80°C. O melhor crioprotetor foi a trealose 0,5 M. Considera-se que os protocolos de criopreservação de FMAs podem ser adaptados para condições mais modestas nas Coleções de Glomeromycotas, utilizando-se o encapsulamento com alginato, trealose como crioprotetor e congelamento direto em ultra freezer a -80°C.

Termos para indexação: Congelamento; Glomeromycota, Coleção biológica, Preservação de germoplasma, Crioprotetores.

¹ Doutoranda da Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência do Solo, Caixa Postal 3037, CEP 37200-900, Lavras/MG. flavialouzeiro20@gmail.com.

² Doutoranda da Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência do Solo, Caixa Postal 3037, CEP 37200-900, Lavras/MG. barbosa.ufrpe@gmail.com.

³ Professor da Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência do Solo, Caixa Postal 3037, CEP 37200-900, Lavras/MG. marcocarbone@ufla.br.

⁴ Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, CEP: 23891-000, Seropédica/RJ. orivaldo.saggin@embrapa.br.

Methodology adaptation for cryopreservation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi spores

Abstract – The cryopreservation is restricted in collections of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) because spores are killed by freezing due to the large size and liquid content. Few studies show success in the cryopreservation of AMF using conditions that are quite expensive and inaccessible to most laboratories. The objective of this study was to evaluate adaptations to the cryopreservation protocols, in an attempt to use the conditions and equipment available in most national research institutions. The effect of encapsulation in sodium alginate on the spore germination of four species of AMF (*Rhizophagus clarus*, *Dentiscutata heterogama*; *Acaulospora morrowiae*, and *Gigaspora margarita*) was tested and, with the species that presented the highest germination, different cryoprotectants and storage were tested at -80°C. The encapsulation of the spores inside alginate pearls promoted a reduction in germination but was not limiting to prevent the germination of the four species. Encapsulation was essential to achieve the germination of *Dentiscutata heterogama* after freezing at -80°C. The best cryoprotectant was 0.5 M trehalose. It is considered that the AMF cryopreservation protocols can be adapted to more modest conditions in the Glomeromycotas Collections, using alginate encapsulation, trehalose as cryoprotectant, and direct freezing at -80°C ultra-low freezer.

Index terms: Freezing; Glomeromycota, Biological collection, Germplasm preservation, Cryoprotectants.

Introdução

Coleções de microrganismos são importantes para a preservação da biodiversidade e como fontes de recursos genéticos para avanço no uso biotecnológico como, por exemplo, na produção de fármacos, inoculantes agrícolas e para despoluição ambiental, entre outros inúmeros usos que a genética microbiana permite. Assim existe uma grande importância da estocagem de amostras viáveis de microrganismos por longos períodos, o que diminui o trabalho e o custo de manutenção das coleções. Tratando-se de coleções de fungos, não existe uma forma ideal que garanta a estocagem e viabilidade por longo prazo, sendo que cada grupo fúngico tem limitações para alguma metodologia de preservação.

Entre as técnicas de preservação a longo prazo, a criopreservação tornou-se uma ferramenta eficaz para conservar várias espécies de fungos (HOMOLKA, 2013). A criopreservação consiste no congelamento e armazenamento dos propágulos fúngicos em temperaturas muito baixas, a -80°C em ultra freezer ou a -196°C em nitrogênio líquido, afim de paralisar completamente as atividades metabólicas (MAZUR, 2004). É bastante versátil e aplicável a um amplo espectro de espécies fúngicas, porém grupos de espécies fúngicas demandam diferentes protocolos de criopreservação (HOMOLKA, 2013).

No caso das coleções de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs), que são do filo Glomeromycota e formam micorrizas altamente comuns e benéficas nas raízes da maioria das plantas, a criopreservação direta dos esporos causa danos irreversíveis aos mesmos devido ao seu grande tamanho e conteúdo líquido (TOMMERUP, 1988). Além disso, os esporos de FMAs são produzidos de forma vegetativa em pequenas quantidades quando comparados aos outros fungos, e somente na presença de raízes vegetais metabolicamente ativas, pois são simbiontes obrigatórios (SAGGIN JÚNIOR et al., 2011). Douds Jr. e Schenck (1990) concluíram que o melhor método de crioproteção e criopreservação de FMAs seria o de secagem lenta do vaso de cultivo e congelamento dos esporos no próprio substrato de cultivo da planta hospedeira, o que ocuparia grande espaço numa coleção com muitos isolados.

Apesar de estudos com diferentes criopreservantes e métodos de desidratação (DOUDS JR.; SCHENCK, 1990; DECLERCK; VAN COPPENOLLE, 2000) a criopreservação dos esporos de FMAs ainda é restrita. Crioprotetores como dimetil sulfoxido (DMSO), glicerol, manitol e sacarose não foram eficientes para proteger dos danos do congelamento os esporos de *Gigaspora margarita* (DOUDS JR.; SCHENCK, 1990). Certa proteção foi obtida pelos autores com o congelamento dos esporos após a incubação dos esporos por dois dias em trealose 1M. Em um outro estudo, Declerck e Van Coppenolle (2000) verificaram a ineficiência da incubação de esporos em glicerol e manitol, antes de serem congelados a -70°C , independente da concentração desses crioprotetores. Neste estudo, os melhores resultados foram obtidos com a incubação dos esporos por um dia em sacarose 0,5 M ou por 1 a 2 dias em trealose 0,5M. Esses autores também verificaram que a incubação em trealose 0,5 M por um dia e congelamento a -100°C permitiu que 100% dos esporos potencialmente infectivos germinassem em meio Strullu-Romand (STRULLU; ROMAND, 1986). Porém a taxa de germinação decresceu rapidamente com temperaturas de congelamento de -140 e -180°C . A sobrevivência dos esporos depois da criopreservação difere dependendo das espécies de FMAs sugerindo que as espécies possuem diferenças de dormência e adaptação às condições edáficas e climáticas (KUSZALA; GIANINAZZI-PEARSON, 2011).

Entre 2012 e 2014 foram publicados resultados mais animadores de criopreservação de FMAs. Um novo protocolo de criopreservação de FMAs preservou com sucesso seis gêneros de Glomeromycota (LALAYMIA et al., 2012; LALAYMIA et al., 2013; LALAYMIA et al., 2014a; LALAYMIA et al., 2014b). Nesse protocolo, os esporos foram encapsulados em alginato e congelados com decréscimo constante de temperatura (controle computadorizado) e armazenados em super freezer a -130°C . Entretanto, poucas coleções de FMAs tem disponibilidade desses equipamentos de controle do decréscimo de temperatura e que atinjam -130°C .

Como as coleções brasileiras de Glomeromycotas geralmente carecem de uma segunda forma de preservação a longo prazo que garanta a estabilidade e viabilidade do material biológico, e diminua a intensidade de repicagem, o objetivo desse estudo foi avaliar adaptações aos protocolos de criopreservação disponíveis, para utilização nas condições e equipamentos disponíveis na maioria das instituições de pesquisa nacionais.

Material e Métodos

Material biológico

O estudo foi conduzido no Laboratório de Microbiologia e Processos Bioquímicos do Solo, no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras. Para a condução da pesquisa foram utilizados esporos das espécies *Rhizophagus clarus* (UFLA 494), *Dentiscutata heterogama* (UFLA 312); *Acaulospora morrowiae* (UFLA 735) e *Gigaspora margarita* (UFLA 730) da Coleção de Fungos Micorrízicos Arbusculares da Universidade Federal de Lavras. Os esporos desses fungos foram extraídos de vasos de cultivo puros de cada linhagem por peneiramento úmido (GERDEMANN; NICOLSON, 1963). Foram separados os esporos íntegros e saudáveis, que foram submetidos à assepsia superficial imergindo-os em solução de hipoclorito de cálcio 1% (m/v) por 10 min e estreptomicina 100 mg/L por mais 10 min. O ciclo foi repetido por 3 vezes, sendo finalizado com a solução de estreptomicina.

Procedimento de encapsulamento em alginato

Os esporos de cada linhagem de FMAs foram encapsulados em alginato de sódio seguindo o procedimento descrito por Declerck e Van Coppenolle (2000) e Lalaymia et al. (2012). Resumidamente, esporos foram suspensos em uma solução a 2% (p/v) de alginato de sódio (Sigma-Aldrich) previamente autoclavada a 121°C, 1,1 kg/cm², por 15 min. Pérolas de alginato contendo em média 20 esporos foram formadas gotejando a solução de alginato com esporos suspensos sobre uma solução de CaCl₂ 0,1 M (autoclavada previamente a 121°C por 15 min) sob agitação constante. O gotejamento foi feito através de uma bomba peristáltica e as pérolas formadas foram agitadas por 30 minutos durante a polimerização. As pérolas foram então lavadas com água deionizada autoclavada (121°C, 1,1 kg/cm² por 15 min) e secas por 24 horas em ambiente asséptico ventilado, em capela de fluxo laminar.

Procedimento experimental

Em um primeiro experimento foi testado o efeito do encapsulamento em alginato sobre a germinação dos esporos. Foram estudadas as quatro

espécies de FMAs (*Rhizophagus clarus*, *Dentiscutata heterogama*; *Acaulospora morrowiae* e *Gigaspora margarita*). Após a assepsia superficial parte dos esporos foi encapsulada e parte foi mantida não-encapsulada. Para avaliação da germinação, ambos os grupos foram dispostos em número de 20 unidades (esporos ou pérolas) em placa de Petri contendo meio Água-Ágar 1% e incubados até 4 semanas no escuro a 27°C. O delineamento foi inteiramente casualizado com três repetições (placas).

O segundo experimento foi conduzido apenas com *Dentiscutata heterogama*, que apresentou a maior percentagem de germinação no primeiro experimento. Neste ensaio foram testados quatro crioprotetores: manitol 1M; sacarose 0,5M; glicerol 200 mL/L e trealose 0,5M e como testemunha utilizou-se água destilada autoclavada. Em todos os tratamentos grupos de 20 esporos ou 20 pérolas de alginato contendo esporos ficaram imersos no crioprotetor por 24 horas a 17°C. Após a drenagem do crioprotetor, os esporos e pérolas foram secas por 24 horas em ambiente ventilado e asséptico em câmara de fluxo laminar. Logo após, antes do congelamento, foi avaliada a germinação em meio Água-Ágar 1%. Em seguida grupos de pérolas e esporos foram colocados em criotubos e congelados diretamente a -80°C em ultra freezer.

Após quatro semanas do congelamento, os criotubos foram retirados e descongelados em temperatura ambiente (27°C). As pérolas foram dispostas em placas de Petri com meio Água-Ágar 1% para avaliar a germinação. A germinação foi monitorada a cada 24 h e quantificada a porcentagem de germinação em relação ao total de esporos ou pérolas.

Os resultados foram submetidos a teste de normalidade e quando atendiam as premissas de normalidade e homocedasticidade submetidos à análise de variância e teste de Scott Knott a 5% de probabilidade na comparação das médias utilizando-se o programa Sisvar (FERREIRA, 2011).

Resultados e Discussão

No primeiro experimento foi possível observar que o encapsulamento dos esporos dentro de pérolas de alginato de sódio promoveu uma redução na germinação, que variou de 13% em *Dentiscutata heterogama* a 33% em *Acaulospora morrowiae*. Entretanto, essa redução não foi limitante para impedir a germinação de todas as quatro espécies de FMAs testadas. A

espécie *Dentiscutata heterogama* destacou-se em ambas condições com a maior percentagem de germinação dos esporos (Figura 1).

No segundo experimento, a avaliação da germinação antes do congelamento demonstrou 100% de germinação tanto dos esporos encapsulados, como dos não-encapsulados (Tabela 1). Entretanto, após quatro semanas de criopreservação, a germinação ocorreu apenas nos esporos encapsulados submetidos aos tratamentos de crioprotetores. A percentagem de germinação variou de 45% nas pérolas de alginato crioprotégidas com glicerol 200 mL/L a 90% nas pérolas crioprotégidas com trealose 0,5 M. (Tabela 1, Figura 2).

A morte dos esporos após a criopreservação sem o uso de encapsulamento com pérolas de alginato e a aplicação de crioprotetores foi comprovada em *Dentiscutata heterogama*. Este resultado confirma a necessidade do encapsulamento e do uso de crioprotetores para criopreservação de esporos de FMAs. Confirma também que as concentrações dos crioprotetores sugeridas por Declerck e Van Coppenolle (2000), exceto o manitol cuja concentração foi dobrada, como eficientes para crioproteção. Este resultado também corrobora os relatos de Lalaymia et al. (2012) que também observaram danos nos esporos não encapsulados.

Os resultados mostraram diferenças significativas nas percentagens de germinação entre os crioprotetores após a criopreservação por 4 semanas, sendo que a trealose 0,5 M é o crioprotetor mais eficiente, o que está de acordo com o verificado por Declerck e Van Coppenolle (2000). A trealose é um dissacarídeo não redutor que consiste em duas moléculas de α -glicose unidas por uma ligação α, α -1,1-glicosídeo encontrada naturalmente em insetos, plantas e alguns microrganismos (PATIST; ZOERB, 2005). É um crioprotetor não penetrante na célula, tendo um efeito na estabilização das proteínas das membranas celulares, embora o mecanismo de ação ainda não esteja totalmente elucidado. Sugere-se que haja formação de ponte de hidrogênio entre o grupo hidroxila da glicose e a extremidade polar dos fosfolípidios das membranas, o que ajuda a manter a integridade da membrana durante as condições de desidratação (CROWE et al., 1998; WOELDERS, 1997). A trealose não penetrando na membrana, também promove condição hipertônica causando desidratação osmótica celular antes do congelamento, o que diminui a água intracelular sujeita à formação de cristais de gelo, diminuindo a quantidade de lesão dentro da célula (STOREY et al., 1998; SCHMEHL et al., 1986; MOLINIA et al., 1994).

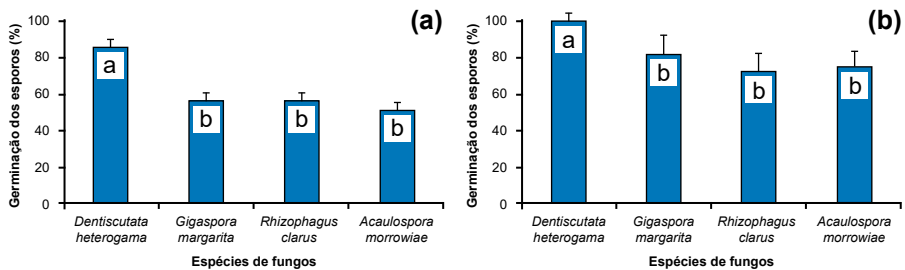


Figura 1. Porcentagem de germinação dos esporos encapsulados (a) e não-encapsulados (b) com alginato de sódio de diferentes espécies de fungos micorrízicos arbusculares. Barra de desvio indica o erro padrão da média. Letras iguais indicam ausência de diferença entre espécies pelo teste de Scott Knott 5% comparando dentro de cada figura.

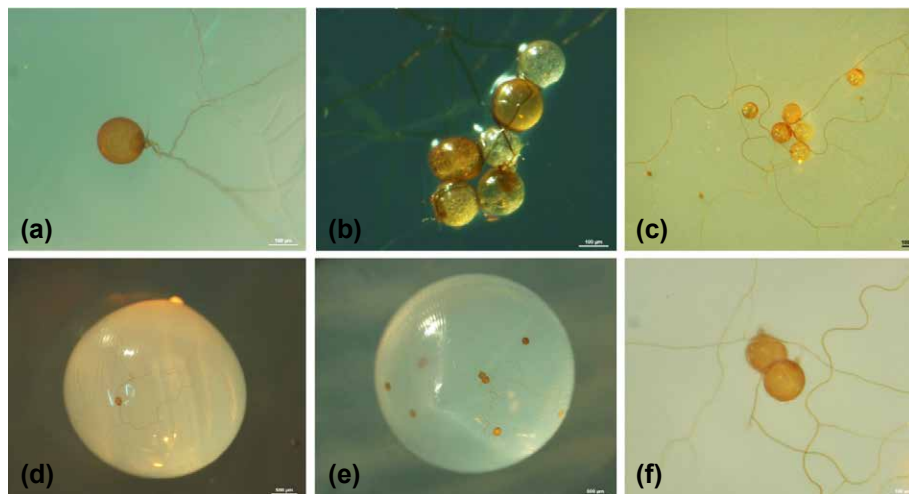
O glicerol foi o crioprotetor que demonstrou a menor porcentagem de germinação apesar de ser considerado o crioprotetor mais utilizado na preservação de microrganismos (HUBÁLEK, 2003). No entanto, a concentração de 20% pode ter provocado efeitos tóxicos para a germinação dos esporos de *Dentiscutata heterogama*, já que ele, ao contrário da trealose, tem ação altamente penetrante nas células (PARKS; GRAHAM, 1992).

Atualmente, a criopreservação em temperatura de -80°C é considerada um método apropriado para manter a estabilidade genética de uma grande

Tabela 1. Porcentagem de germinação dos esporos da *Dentiscutata heterogama* sob ação dos crioprotetores e encapsulamento com alginato de sódio.

Tratamento com crioprotetor	Antes da criopreservação		Após a criopreservação	
	não-encapsulados	encapsulados	não-encapsulados	encapsulados
Trealose 0,5M	100	100	0	90 a
Manitol 1M	100	100	0	60 b
Sacarose 0,5M	100	100	0	65 b
Glicerol 20%	100	100	0	45 c
Água estéril	100	100	0	0 d

Médias seguidas de uma mesma letra não diferem significativamente pelo Scott Knott a 5%. Coeficiente de variação da análise de variância: 8,6%.



Fotos: Flávia Louzeiro de Aguiar Santiago

Figura 2. Imagens da germinação dos esporos de *Dentiscutata heterogama* sem encapsulação (figuras a-c) e de esporos encapsulados dentro de pérolas de alginato de sódio, incubados com o crioprotetor trealose 0,5 M após do congelamento a -80°C por 4 semanas (figuras d-f).

quantidade de fungos filamentosos (LLOYD, 1994), e é o método de longo prazo mais acessível aos laboratórios brasileiros. O presente estudo mostra que foi viável o seu uso para a criopreservação de *Dentiscutata heterogama* por um curto período de tempo, com o procedimento de encapsulamento, e incubação com crioprotetores, particularmente a trealose 0,5 M. São sugeridos ensaios futuros buscando analisar a criopreservação por períodos mais prolongados e a capacidade de infecção dos esporos armazenados em plantas, além de ampliar o teste com outras espécies de FMAs.

Conclusão

As adaptações dos protocolos de criopreservação de FMAs de Declerck e Van Coppenolle (2000) e Lalaymia et al. (2012) para condições mais modestas comuns nas Coleções de Glomeromycotas brasileiras, utilizando ultra freezer -80°C proporcionaram resultados positivos para a espécie *Dentiscutata heterogama*, e podem ser avaliadas para períodos de preservação mais longos e com outras espécies de FMAs.

Referências bibliográficas

- CROWE, J. H.; CARPENTER, J. F.; CROWE, L. M. The role of vitrification in anhydrobiosis. **Annual Review of Physiology**, v. 60, p. 73-103, 1998.
- DECLERCK, S.; VAN COPPENOLLE, M. G. Cryopreservation of entrapped monoxenically produced spores of an arbuscular mycorrhizal fungus. **New Phytologist**, v. 148, p. 169-176, 2000.
- DOUDS Jr., D. D.; SCHENCK, N. C. Cryopreservation of spores of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v. 115, p. 667-647, 1990.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of British Mycological Society**, Cambridge, v. 46, n. 2, p. 235-244, 1963.
- HOMOLKA, L. Methods of Cryopreservation in Fungi. In: GUPTA V.; TUOHY M.; AYYACHAMY M.; TURNER K.; O'DONOVAN A. (Ed.). **Laboratory Protocols in Fungal Biology**. Fungal Biology. New York: Springer, 2013. p. 9-16.
- HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v. 46, n.3, p. 205-229, 2003.
- KUSZALA, C.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Méthodes de conservation hors sol des champignons mycorrhizogènes à arbuscules et effets de la dessiccation et de la température sur leur survie. **Cah. Tech. Inra** v. 73, p. 5-23, 2011.
- LALAYMIA, I.; CRANENBROUCK, S.; DECLERCK, S. Maintenance and preservation of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, v. 24, n. 5, p. 323-337, 2014a.
- LALAYMIA, I.; CRANENBROUCK, S.; DRAYE, X.; DECLERCK, S. Preservation at ultra-low temperature of in vitro cultured arbuscular mycorrhizal fungi via encapsulation-drying. **Fungal Biology**, v. 116, n. 10, p. 1032-1041, 2012.
- LALAYMIA, I.; DECLERCK, S.; CRANENBROUCK, S. Cryopreservation of in vitro-produced Rhizophagus species has minor effects on their morphology, physiology, and genetic stability. **Mycorrhiza**, v. 23, n. 8, p. 675-682, 2013.
- LALAYMIA, I.; DECLERCK, S.; NAVEAU, F.; CRANENBROUCK, S. Cryopreservation of arbuscular mycorrhizal fungi from root organ and plant cultures. **Mycorrhiza**, v. 24, n. 3, p. 233-237, 2014b.
- LLOYD, D. H. The preservation and maintenance of living fungi. In: SMITH, D.; ONIONS, A.H.S. **Veterinary Dermatology**, 2nd edition, v. 5, p. 215-215, 1994.
- MAZUR, P. Principles of cryobiology. In: FULLER, B. J.; LANE, N.; BENSON, E. E. (Eds.). **Life in the frozen state**. 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 2004, cap. 1, p. 3-65.
- MOLINIA, F. C.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. In vitro evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. **Reproduction Nutrition Development**, v. 34, p. 491-500, 1994.
- PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 209-222, 1992.

PATIST, A.; ZOERB, H. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces*, v. 40, p. 107-113, 2005.

SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; BORGES, W. L.; NOVAIS, C. B.; SILVA, E. M. R. **Manual de curadores de germoplasma - micro-organismos: fungos micorrízicos arbusculares**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 23 p. 2011. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 334; Embrapa Agrobiologia. Documentos, 290; Embrapa Amapá. Documentos, 76).

SCHMEHL, M. K.; VASQUEZ, I. A.; GRAHAM, E. F. The effects of nonpenetrating cryoprotectants added to TEST-yolk-glycerol extender on the post-thaw motility of ram spermatozoa. *Cryobiology*, v. 23, n. 6, p. 512-517, 1986.

STOREY, B. T.; NOILES, E. E.; THOMPSON, K. A. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, v. 37, n. 1, p. 46-58, 1998.

STRULLU, D. G.; ROMAND, C. Méthode d'obtention d'endomycorhizes à vésicules et arbuscules en conditions axéniques. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, v. 303, n. 3, p. 245-250, 1986.

TOMMERUP, I. C. Long-term preservation by L-drying and storage of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, v. 90, n. 4, p. 585-591, 1988.

WOELDERS, H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Vet Q*, v.19, n. 3, p. 135-138, 1997.

Embrapa

Agrobiologia

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL