

***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura e Pecuária***

DOCUMENTOS 385

Guia prático de Criopreservação técnicas aplicadas à conservação de germoplasma vegetal

*Izulmé Rita Imaculada Santos
Antonieta Nassif Salomão*

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica – PqEB
Av. W5 Norte (final)
CEP: 70770-917 Brasília, DF
Fone: (61) 3448-4700/(61) 3448-4739
www.embrapa.br/hortalicas
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações da
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Presidente

Marcelo Lopes da Silva

Secretária-executiva

Ana Flávia do Nascimento Dias

Membros

Andrielle Câmara Amaral Lopes

Bruno Machado Teles Walter

Débora Pires Paula

Edson Junqueira Leite

Marcos Aparecido Gimenes

Solange Carvalho Barrios Roveri José

Supervisão editorial

Ana Flávia do Nascimento Dias

Normalização bibliográfica

Rosamares Rocha Galvão

Projeto gráfico

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Diagramação e capa

Júlio César da Silva Delfino

Foto da capa

Cláudio Bezerra

1ª edição

Publicação digital (2023): PDF

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, Superintendência de Serviços Compartilhados

Santos, I. R. I.

Guia prático de criopreservação: técnicas aplicadas à conservação de
germoplasma vegetal. / Izulmé Rita Imaculada Santos, Antonieta Nassif
Salomão. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2023.

PDF (37 p.) : il. color. (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia, 385).

1. Criopreservação de plantas. I. Salomão, A. N. II. t. II. Série.

581.15 CDD21

Rosamares Rocha Galvão (CRB-1/2122)

© Embrapa, 2023

Autores

Izulmé Rita Imaculada Santos

Bióloga, doutora em Fisiologia do Estresse Vegetal, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

Antonieta Nassif Salomão

Engenheira Florestal, mestre em Manejo do Espaço Rural, pesquisadora da Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

Apresentação

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia mantém em seu Banco Genético, de acordo com os padrões mundiais de conservação, o banco convencional de germoplasma-semente, o banco in vitro e o banco criogênico.

A criopreservação é a única técnica disponível atualmente para a preservação em longo prazo do germoplasma de espécies de plantas que são propagadas vegetativamente ou que possuem sementes não longevas, recalcitrantes ou intermediárias. Para essas espécies, as metodologias convencionais usadas em bancos de germoplasma-semente e in vitro não são eficientes para sua preservação em longo prazo.

A criopreservação compreende a conservação de material biológico a temperaturas ultrabaixas, geralmente em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, ou em sua fase de vapor a $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$. Essa metodologia alcançou grande progresso nos últimos trinta anos com o desenvolvimento de protocolos para mais de cem espécies vegetais.

Para a conservação em condições criogênicas, os protocolos são ajustados ou estabelecidos, de acordo com a espécie ou o genótipo ou o ecótipo, bem como da estrutura a ser utilizada. Isso faz com que as distintas técnicas de criopreservação sejam mais elaboradas e aprimoradas, pois são espécie-específicas e visam estabelecer critérios que garantam não só a sobrevivência do material, mas também, sua integridade estrutural e funcional.

Este documento visa divulgar a criopreservação e informar a comunidade científica brasileira envolvida com conservação de germoplasma vegetal sobre as vantagens de adotá-la e sua potencial aplicabilidade para os recursos genéticos de plantas. Dessa maneira, é feita uma abordagem abrangente do estado do conhecimento atual na área de criopreservação, das técnicas mais comumente utilizadas e de seus princípios biológicos, biofísicos e bioquímicos fundamentais para o entendimento e o desenvolvimento dessa metodologia.

Marcelo Lopes da Silva

Chefe-Geral da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Sumário

Introdução.....	9
Técnicas de Criopreservação	12
Congelamento lento (metodologia clássica).....	12
Descrição das etapas do procedimento de congelamento lento.....	13
Vitrificação.....	15
Descrição das etapas do procedimento de vitrificação com PVS2.....	16
Descrição das etapas do procedimento de vitrificação-gotejamento.....	18
Encapsulamento-desidratação	20
Descrição das etapas do procedimento de encapsulamento-desidratação.....	21
Descrição das etapas do procedimento de “cryoplates”.....	23
Descrição das etapas do procedimento de encapsulamento-vitrificação.....	24
Desidratação-congelamento.....	25
Descrição das etapas do procedimento de desidratação-congelamento.....	26
Fatores que afetam a sobrevivência à criopreservação.....	28
Desidratação.....	28
Congelamento	29
Descongelamento.....	30
Regeneração	30
Métodos para avaliação da viabilidade	31
Resultados alcançados.....	32
Conclusões e perspectivas.....	33
Agradecimentos.....	34
Referências.....	34

Introdução

À medida que a população mundial aumenta, as fronteiras agrícolas e urbanas se expandem ocupando o habitat natural de numerosas espécies de plantas e animais (Stushnoff; Seufferheld, 1995). Este fenômeno vem causando rápida e profunda erosão da diversidade genética em populações de espécies de plantas nativas ou mesmo provocando sua extinção (Villalobos et al., 1991). A erosão genética tem ocorrido também devido à substituição de cultivares domésticas e raças locais (“landraces”), selecionadas por pequenos agricultores, comunidades quilombolas e povos indígenas devido a seu valor nutricional, resistência a doenças e estresses ambientais, ou pelo valor cultural, por cultivares melhoradas que possuem diversidade genética mais restrita (Villalobos et al., 1991).

A conservação de germoplasma como uma atividade científica foi proposta nos anos 70 como uma medida de prevenção deste processo de erosão genética e para o melhoramento da produtividade agrícola (International Board for Plant Genetic Resources, 1993). A conservação de germoplasma de raças locais, cultivares domésticas, variedades tradicionais e parentes silvestres de espécies agronômicas tem sido uma das mais importantes áreas de pesquisa no campo da botânica desde então. Seu principal objetivo é o desenvolvimento de técnicas para a conservação em longo prazo da variabilidade genética dessas espécies com a máxima integridade genética e biológica possível (Bajaj, 1995).

Existem duas estratégias básicas de conservação: a *in situ* e a *ex situ* (Consultative Group on International Agricultural Research, 1993). A conservação *in situ* refere-se à manutenção das espécies selecionadas no seu habitat natural em parques, reservas biológicas ou reservas ecológicas. Um importante componente da conservação *in situ* é manejo on farm das espécies realizado pelos povos indígenas, comunidades tradicionais e por agricultores familiares. A conservação *ex situ* mantém as espécies vegetais fora do seu ambiente natural, em coleções de plantas no campo, em bancos de sementes, em coleções de plântulas em bancos *in vitro* ou em coleções criogênicas.

Sementes são a forma mais comum de conservação *ex situ*, já que esta é a unidade de propagação natural para a maioria das espécies de plantas superiores. Muitas espécies produzem sementes ortodoxas, isto é, sementes que podem ser desidratadas entre 3% e 7% do teor de umidade inicial e armazenadas em câmaras frias com temperatura de aproximadamente -18°C (Roberts, 1973). Nestas condições a longevidade das sementes pode ser prolongada por muitas décadas de forma previsível e por esta razão, estas condições de armazenamento são adotadas pela maioria dos bancos de germoplasma.

Várias outras espécies de plantas necessitam de procedimentos de conservação alternativos. Este é o caso de espécies que se reproduzem exclusivamente por propagação vegetativa porque: a) não produzem sementes viáveis; b) apresentam intensa heterozigosidade ou elevada segregação, o que pode resultar na expressão de caracteres indesejáveis na população; c) são espécies arbóreas de grande porte que demoram muitos anos para passar do estágio juvenil para o estágio adulto reprodutivo. No caso dessas espécies, é mais apropriado conservar outro propágulo que não a semente em bancos de germoplasma *in vitro* ou a planta em bancos no campo. Tais procedimentos são eficientes para a conservação de coleções por curto e médio prazos.

A possibilidade de obter plantas inteiras a partir de células isoladas, tecidos e órgãos de plantas, usando técnicas de cultura de tecidos, levou ao estabelecimento dos bancos de germoplasma *in vitro*. Esta técnica foi concebida para ser uma alternativa para a conservação de espécies com sementes recalcitrantes, intermediárias ou propagadas vegetativamente (Engelmann, 1991; Kartha, 1985). A conservação *in vitro* envolve a manutenção de culturas em crescimento ativo por meio de

subcultivos periódicos de ápices caulinares, brotações e segmentos nodais. Este método tem sido aplicado com sucesso para a conservação de numerosas espécies de importância econômica tais como: café (*Coffea arabica* L.), morango (*Fragaria* spp.), banana (*Musa* spp.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), batata (*Solanum* spp.), batata-doce (*Ipomea batatas*) e videiras (*Vitis* spp.) (Bajaj, 1995). Altas taxas de multiplicação, produção de matrizes livres de patógenos, redução da erosão genética, redução de demanda por espaço, redução de custos com mão de obra, e simplificação do intercâmbio internacional de germoplasma, são algumas das vantagens de um banco de germoplasma in vitro (Engelmann, 1991; Stushnoff; Seufferheld, 1995). Entretanto, existem desvantagens relacionadas principalmente à necessidade de frequentes subculturas, tais como a possibilidade de erros de identificação e contaminação com micro-organismos e necessidade de instalações e mão de obra especializada para a manutenção da coleção de germoplasma. Além disto, a conservação in vitro, sob condições de crescimento lento, assegura a conservação do germoplasma vegetal somente por curtos períodos (seis a doze meses), dependendo do procedimento ou da espécie de planta.

A conservação em bancos a campo apresenta como desvantagens alto custo em função da área requerida para manter a coleção de germoplasma e da mão de obra exigida para realizar ações de manutenção da coleção, como poda, controle de pragas, pragas e ervas daninhas, polinização, propagação, fertilização, entre outros. Igualmente preocupante é o fato de que plantas conservadas no campo estão vulneráveis ao ataque de pragas e doenças e a desastres climáticos, os quais podem subitamente dizimar parte ou mesmo toda a coleção (Engelmann, 1991; Stushnoff, 1987). Além disto, a manutenção de genótipos diferentes em um só local pode expor algumas linhagens a severo estresse fisiológico, causando redução no vigor e mesmo morte das plantas.

A criopreservação tem sido proposta como método eficiente, econômico e seguro para a conservação de espécies de planta que, não estão fisiologicamente programadas para a conservação nas condições descritas acima (Jenderek; Reed, 2017). Sementes de numerosas espécies arbóreas e arbustivas, nativas de regiões tropicais e subtropicais, e mesmo muitas espécies cultivadas de importância econômica tais como dendê (*Elaeis oleifera* [Kunth.] Cortes), coco da Bahia (*Cocos nucifera* L.), borracha (*Hevea brasiliensis* M. Arg.) e cacau (*Theobroma cacao* L.) são danificadas e perdem a viabilidade quando armazenadas em baixas temperaturas ou temperaturas subzero. Essas sementes são chamadas recalcitrantes (Roberts, 1973; Roberts; Ellis, 1989).

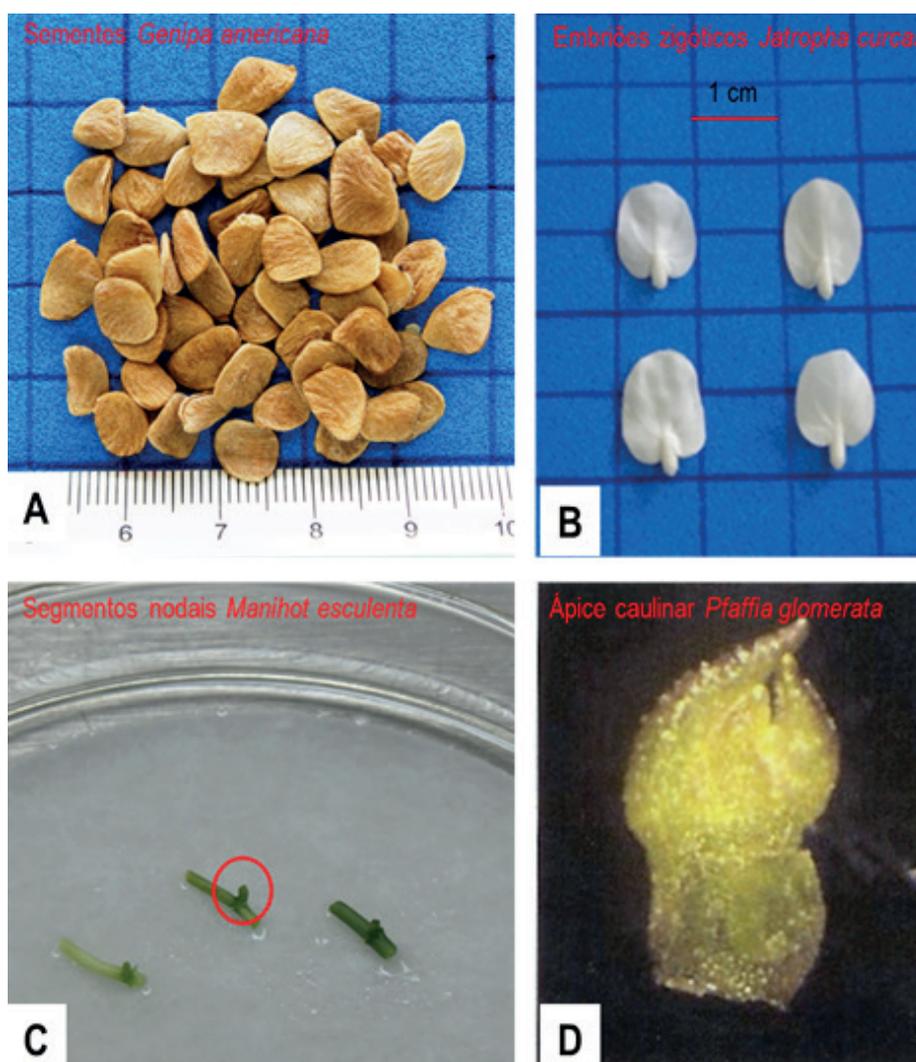
Existem ainda outras espécies de plantas (*Coffea* spp., *Citrus* spp.) cujas sementes podem tolerar desidratação a níveis relativamente baixos de teor de umidade, mas são danificadas por exposição a temperaturas abaixo de zero quando estão secas. Sementes que apresentam este comportamento são classificadas como intermediárias (Ellis et al., 1990; 1991). A metodologia convencional estabelecida para a conservação de sementes ortodoxas não pode ser aplicada a sementes recalcitrantes ou intermediárias, e por isto métodos de conservação alternativos são necessários (Engelmann, 1991; 1997). Esses métodos devem ser eficientes e garantir sistema de conservação em longo prazo para estruturas organizadas, com alta estabilidade genética e biológica de espécies propagadas vegetativamente e as com sementes recalcitrantes ou intermediárias.

Na atualidade a criopreservação é a única técnica capaz de atender estes pré-requisitos. Criopreservação é definida como a conservação de material biológico em nitrogênio líquido a -196 °C, ou em sua fase de vapor a -150 °C (Kartha, 1985). Nos últimos trinta anos numerosos relatos de criopreservação de plantas de propagação vegetativa, cereais e gramíneas, plantas ornamentais, frutíferas tropicais e temperadas, leguminosas e oleaginosas, estimulantes, medicinais e aromáticas, entre outras, foram publicados na literatura (Tabelas 1 e 2). Diferentes técnicas foram utilizadas em cada caso, incluindo a criopreservação de protoplastos, suspensões celulares, calos, gemas

apicais e laterais, meristemas, sementes, embriões somáticos e zigóticos e produtos biotecnológicos (culturas produtoras de metabólitos secundários de interesse econômico e linhagens celulares geneticamente modificadas), conforme exemplificado na Figura 1 (Yongjie et al., 1997; Sakai, 1995; Stushnoff; Seufferheld, 1995).

A capacidade de tecidos vegetais sobreviverem à criopreservação depende da sua tolerância à desidratação e à temperatura do nitrogênio líquido (-196°C). Por isto, o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação requer conhecimento de mecanismos bioquímicos e biofísicos associados com a resposta dos tecidos à desidratação e ao congelamento (Stushnoff; Seufferheld, 1995). Os únicos estados físicos existentes abaixo de aproximadamente -130°C são o estado cristalino ou o estado vítreo, e em ambos a viscosidade é muito elevada, a difusão é considerada insignificante (dependendo da escala de tempo da armazenagem), a energia cinética molecular é muito baixa e reações metabólicas impulsionadas por energia térmica ocorrerão muito lentamente ou serão paralisadas completamente (Karth, 1985). Portanto, à temperatura do nitrogênio líquido (NL) a viabilidade durante o armazenamento pode ser estendida por muitos anos e alta estabilidade genética pode ser mantida (Stushnoff; Seufferheld, 1995).

Nesta publicação serão apresentadas as técnicas mais utilizadas para a criopreservação de plantas.



Fotos: Izulmé Rita Imaculada Santos

Figura 1. Exemplos de estruturas vegetais que podem ser criopreservadas: A - sementes inteiras; B - embriões zigóticos; C - segmentos nodais de plântulas em crescimento in vitro contendo uma gema axilar (circundada em vermelho); D - ápice caulinar com aproximadamente 4 mm de comprimento, formado por segmento de caule e região meristemática envolta por dois pares de primórdios foliares.

Técnicas de Criopreservação

O aprimoramento das técnicas de criopreservação iniciadas no final do século XIX permitiu que, atualmente, vários organismos e estruturas biológicas sejam conservados por tempo indefinido e de maneira a deter quase completamente seu metabolismo basal.

Alguns fatores determinam o sucesso da criopreservação como a adequação da técnica (uso de crioprotetores, taxas de congelamento e descongelamento, condições de regeneração) ao tipo de material (tamanho, estágio de desenvolvimento, habilidade para tolerar estresses hídrico e térmico) a ser conservado.

As técnicas disponíveis atualmente para a criopreservação estão embasadas nos princípios clássicos, em que a dessecação do material é feita por meio do congelamento lento e moderno, em que se adota o processo de vitrificação, do qual derivaram-se outros processos (Marco-Medina; Serrano-Martínez, 2012).

A seguir serão descritos os princípios e os procedimentos concernentes a cada técnica. Os procedimentos devem ser ajustados de acordo com as especificidades da espécie em estudo.

Congelamento lento (metodologia clássica)

Os primeiros protocolos de criopreservação de tecidos vegetais eram baseados no congelamento lento. Esta técnica envolve o congelamento lento até uma temperatura previamente definida (temperatura de pré-congelamento, por volta de -40°C) a uma velocidade de congelamento definida (1 a $10^{\circ}\text{C}/\text{hora}$), usando um congelador programável seguida de imersão direta em nitrogênio líquido (Engelmann, 1997). Este método foi baseado nos eventos físico-químicos que ocorrem durante o processo de congelamento, os quais foram descritos por Mazur (1963; 1969). À medida que a temperatura decresce aproximando-se de 0°C , a célula e seu meio externo inicialmente atingem um estado de super-resfriamento (“supercooling”) e posteriormente, ocorre a formação de gelo no meio extracelular. O conteúdo da célula super-resfriada permanece descongelado possivelmente, porque a parede celular e a membrana plasmática agem como barreiras, prevenindo que os cristais de gelo presentes nos espaços intercelulares penetrem a célula e desencadeiem o congelamento do citoplasma. Os eventos físicos subsequentes irão depender da velocidade de congelamento. Se o congelamento ocorre lentamente, a célula supercongelada perde água porque a pressão de vapor da água na célula excede aquela do exterior celular congelado, e com a progressiva redução da temperatura a água se difunde do interior das células para a solução extracelular e é convertida em gelo na superfície das células ou entre o protoplasto e a parede celular. Como resultado, a concentração da solução celular aumenta e a célula perde turgor. Esse fenômeno é chamado de desidratação induzida por congelamento (“freeze-induced desiccation”). Em tais casos, a célula desidrata-se reduzindo a um mínimo, ou removendo completamente a água livre, evitando a formação de gelo em seu interior. Quando o potencial hídrico das células parcialmente desidratadas se iguala aquele do gelo extracelular, um equilíbrio é estabelecido e desidratação adicional não ocorrerá contanto que a temperatura permaneça constante. Por outro lado, se a célula for congelada muito rapidamente a desidratação por congelamento não ocorre, as células se tornam cada vez mais super-resfriadas e eventualmente, a solução intracelular, que contém alto teor de água livre, congela-se formando cristais de gelo e causando injúria mecânica às células (Steponkus; Webb, 1992).

Após o descongelamento rápido as células intactas podem reabsorver água e ganhar turgor novamente (Sakai; Larcher, 1987). Entretanto, se as células são desidratadas em excesso elas

podem ser danificadas pela exposição aos efeitos nocivos da concentração elevada dos eletrólitos celulares (efeitos de solução). Em condições experimentais apropriadas, quando as células atingem a temperatura de pré-congelamento, a maior parte da água congelável já escapou para se tornar gelo no meio externo e a exposição à temperatura do nitrogênio líquido tem muito pouco efeito adverso (Kantha, 1985; Sakai, 1995).

O método de congelamento lento é um procedimento complexo no qual a concentração de crioprotetores, o tempo de exposição aos crioprotetores, a velocidade de congelamento e a temperatura de pré-congelamento têm um papel crítico na preservação da viabilidade do material. Além disso, é um método com alto custo, que requer precisos ajustes do congelador programável, pode causar desidratação excessiva do material biológico e é de difícil utilização com espécies tropicais.

I. Descrição das etapas do procedimento de congelamento lento

1. Materiais necessários:

- Material vegetal: suspensões celulares, calos, ápices caulinares;
- Instrumentos, utensílios e equipamentos: bisturi, cabine de fluxo laminar, canisters, cânulas, criotubos, papel filtro, pinças, pipetas plásticas de Pasteur e de vidro, agitador magnético, congelador programável, microscópio estereoscópico, nitrogênio líquido e outros.

2. Meios de cultura e soluções:

- O meio de cultura MS-62 (Murashige; Skoog, 1962) sólido ou líquido é usado para a introdução e multiplicação de explantes antes do congelamento em NL e sua regeneração após o congelamento;
- Os crioprotetores comumente adotados são glicerol, etileno glicol, propileno glicol, sacarose e dimetil sulfoxido (DMSO). As concentrações e os tempos de exposição nas soluções crioprotetoras dependerão do explante a ser criopreservado. Como exemplos têm que a solução de glicerol é usada para explantes pequenos (1 mm) ou células isoladas, enquanto que a solução de DMSO é usada para explantes maiores e estruturas mais complexas.

3. Introdução e multiplicação in vitro da espécie em estudo:

Isolar e introduzir in vitro meristemas, gemas laterais, segmentos nodais coletados de plantas em crescimento em campo ou casa de vegetação em meio de cultura para introdução, regeneração e multiplicação in vitro. Após 4-6 semanas de cultivo in vitro, repicar plântulas obtidas por meio de segmentos nodais, ou isolar células ou calos para produzir estoque de explantes a ser usado nos experimentos de criopreservação.

4. Cultivo de explantes in vitro:

Isolar segmentos nodais das plântulas obtidas in vitro, transferir para frasco Magenta contendo 30 ml de meio de cultura sólido e cultivá-los por 14 dias em sala de crescimento nas condições de cultivo padrão. Subcultivar células em suspensão em meio líquido ou calos em meio sólido e mantê-los por 14 dias em sala de crescimento nas condições de cultivo padrão.

5. Isolamento de explantes para a criopreservação pelo método de congelamento lento:

- Isolar ápices caulinares, calos ou células em suspensão e, de acordo com o explante/espécie selecionado, determinar a concentração e o tempo de exposição e a solução crioprotetora.

6. Pré-congelamento de explantes:

- Dispor os explantes em criotubos acondicionados em recipiente contendo gelo;
- Adicionar a solução crioprotetora apropriada aos criotubos, mantendo os explantes nessa solução por 1 h;
- Transferir os criotubos para as cânulas e essas para o congelador programável regulado à temperatura de 0 °C;
- Diminuir a temperatura do congelador com regime de resfriamento de 0,3 a 0,5 °C/min., até que se atinja a temperatura de pré-congelamento de -40 °C;
- Retirar as cânulas do congelador programável e transferi-las rapidamente para os canisters.

7. Congelamento em NL, descongelamento rápido e regeneração dos explantes:

- Mergulhar os canisters rapidamente em nitrogênio líquido (-196 °C, velocidade de congelamento de aproximadamente -200 °C.min-1). Os canisters devem permanecer mergulhados em NL por no mínimo 1 h antes de se fazer o descongelamento;
- Remover os canisters do NL e com o auxílio de uma pinça retirar as cânulas mergulhando-as rapidamente em banho-Maria com água destilada esterilizada (37 °C – 40 °C) por 2 min, sob agitação constante;
- Com o auxílio de uma pipeta remover a solução crioprotetora dos criotubos ou retirando-se os explantes dos criotubos com o auxílio de uma pinça e dispô-los em placa de Petri com papel filtro;
- Inocular os explantes em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura de introdução, regeneração e multiplicação, embrulhar a grade com papel pardo, levá-la à sala de crescimento e cultivar no escuro por uma semana. Transcorrido esse tempo, desembulhar a grade e cultivar os explantes nas condições de iluminação padrão da sala. Observar os explantes diariamente e anotar os resultados no formulário de acompanhamento de experimento. Explantes contaminados devem ser removidos imediatamente e a retirada deve ser registrada no formulário de acompanhamento de experimento.

Na Figura 2 estão ilustradas as etapas para a criopreservação de estruturas vegetais adotando-se a técnica de congelamento lento.

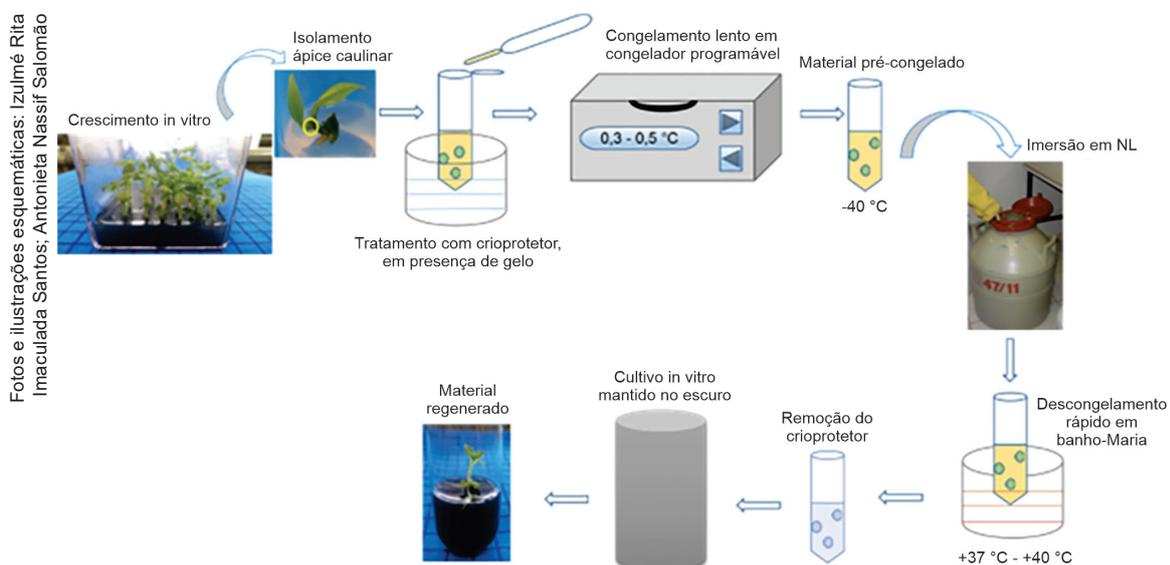


Figura 2. Etapas do procedimento para o congelamento lento de estruturas vegetais.

Vitrificação

Atualmente, a vitrificação é o processo no qual as técnicas mais recentes de criopreservação estão fundamentadas. Vitrificação é o processo no qual a água sofre uma transição da fase líquida para um estado sólido amorfo e meta-estável, chamado estado vítreo (Franks, 1982; Fahy et al., 1984). O sólido assim formado é na verdade uma solução supersaturada e de alta viscosidade, o que lhe confere as propriedades mecânicas de um sólido embora não haja formação de uma estrutura cristalina. A transição para o estado vítreo não envolve mudanças químicas, mas apenas mudanças físicas na viscosidade do líquido. A vitrificação do citoplasma pode ser obtida experimentalmente antes do congelamento em nitrogênio líquido por meio da desidratação dos tecidos para um teor de água em que não existe água livre para a cristalização. Com isto, a solução celular se torna muito concentrada e pode passar pela transição de vitrificação quando uma velocidade de congelamento apropriada é utilizada, evitando desse modo, a formação de cristais de gelo durante a exposição a temperaturas subzero.

A desidratação do material pode ser obtida por evaporação da água ou por tratamento com soluções de vitrificação altamente concentradas de crioprotetores como dimetilsulfóxido (DMSO), etileno glicol, metanol, glicerol, propileno glicol, dentre os mais comuns. Entretanto, esses crioprotetores podem causar citotoxicidade e estresse osmótico, levando à morte das células ou modificando sua resposta morfogênica em cultura após o congelamento (Sakai, 1995; Kartha, 1985).

Mais recentemente açúcares como a sacarose, trealose e glucose têm sido utilizados como substâncias crioprotetoras porque eles são excelentes agentes vitrificadores e além disto, não apresentam toxicidade para as células vegetais mesmo quando se acumulam em grande quantidade no citoplasma. Açúcares mostram alta eficiência na estabilização das membranas celulares durante o congelamento, em comparação com os crioprotetores tradicionais. Seu efeito protetor está supostamente associado à vitrificação das membranas celulares no citoplasma (Hirsh, 1987; Leopold, 1990; Koster, 1991). Evidência do efeito protetor dos açúcares pode ser observada em plantas de clima temperado. Estas plantas acumulam carboidratos solúveis em seus tecidos durante a aclimação ao frio, na natureza ou sob condições experimentais. O período em que tais plantas são mais tolerantes ao congelamento corresponde ao ponto de máximo acúmulo destes compostos (Sakai; Yoshida, 1968; Stushnoff et al., 1993; Imanishi et al., 1998). De modo semelhante, grande quantidade de açúcares como a sacarose, trealose e oligossacarídeos de cadeia longa (rafinose e estaquiose) acumulam-se em estruturas que são tolerantes a intensa desidratação. Este é o caso de esporos de fungos, leveduras, musgos, samambaias, sementes e pólen da maioria das angiospermas (Crowe et al., 1988; Hoekstra et al., 1994; Oliver, 1996).

O modo de ação dos açúcares na aquisição da tolerância à desidratação e ao congelamento ainda não é totalmente conhecido e uma correlação direta de causa e efeito ainda não foi demonstrada. Existem evidências de que o modo de ação dos açúcares envolve múltiplos componentes. Primeiro, açúcares podem agir como agentes osmóticos externos, removendo o excesso de água intracelular através de um gradiente osmótico (Dumet et al., 1993). Outra hipótese, denominada hipótese da substituição da água ("water replacement hypothesis"), é que estes açúcares podem substituir a água removida das biomoléculas, mantendo as estruturas hidrofílicas na sua orientação hidratada mesmo depois da água ter sido removida. Essa hipótese foi proposta com base em resultados obtidos em experimentos com um sistema de membranas modelo. Observou-se que os grupos hidroxila dos açúcares (sacarose e trealose) se ligam aos grupos hidrofílicos das cabeças polares dos fosfolípidios e grupos funcionais das proteínas da bi-camada da membrana através de pontes de hidrogênio, substituindo as moléculas de água removidas (Crowe et al., 1984, 1988, 1990, 1997). Com isto, as interações hidrofílicas necessárias são mantidas e se evita a fusão dos grupos cabeças

polares, e conseqüentemente a transição de fase das membranas da fase líquida cristalina para a fase de gel, de modo que a integridade estrutural (permeabilidade seletiva) das membranas desidratadas foi mantida (Crowe et al., 1988, 1990,1997).

O processo de vitrificação tornou-se um dos principais métodos de crioproteção de estruturas vegetais durante a criopreservação, tendo sido aplicado a uma ampla variedade de tecidos vegetais. Uma grande vantagem deste método é que os tecidos vitrificados podem ser congelados rapidamente, pelo mergulho direto em nitrogênio líquido, eliminando assim a necessidade de usar congeladores programáveis. Durante o rápido decréscimo da temperatura, em contraste com o congelamento lento, não há tempo suficiente para o crescimento de cristais de gelo no espaço intracelular, e com isto as células passam rapidamente pela zona de temperatura na qual o crescimento letal de cristais de gelo ocorre (Luyet, 1937).

O estado vítreo tem muitos outros efeitos benéficos para a célula desidratada, como por exemplo, limitação da perda de água, limitação da cristalização de sais e proteínas no citoplasma, proteção contra mudanças no pH à medida que a água é removida, e prevenção de colapso celular durante extensiva perda de água (Leopold, 1990; Koster, 1991). A vitrificação restringe a difusão de substratos e produtos dentro da célula, levando a um estado de aquiescência metabólica e resultando na prevenção de reações químicas dependentes do processo de difusão (Koster, 1991). Devido a essas características do estado vítreo, a deterioração de sistemas biológicos é suprimida, assegurando a estabilidade durante o período de quiescência.

II. Descrição das etapas do procedimento de vitrificação com PVS2 (Plant Vitrification Solution 2)

1. Materiais necessários:

- Material vegetal: ápices caulinares, gemas laterais, meristemas, eixos embrionários, embriões;
- Instrumentos, utensílios e equipamentos: bisturi, cabine de fluxo laminar, canisters, cânulas, criotubos, lâminas, papel filtro, pinças, pipetas plásticas de Pasteur e de vidro, placas de Petri, agitador magnético, microscópio estereoscópico, nitrogênio líquido e outros.

2. Meios de cultura e soluções:

- O meio de cultura MS-62 (Murashige; Skoog, 1962) é usado em todas etapas do procedimento para a introdução, multiplicação in vitro de segmentos nodais, pré-cultivo dos explantes e regeneração dos explantes após o congelamento em NL;
- Meio de pré-cultivo MS-62 líquido + 0,4 M de sacarose;
- Solução de saturação ("loading") = MS-62 líquido + 1,6 M de sacarose + 2,0 M de glicerol;
- Solução de vitrificação PVS2 (Solução de vitrificação de plantas) (Sakai et al, 1990) = MS-62 líquido + glicerol (30%) + etilenoglicol (15%) + DMSO (15%) + sacarose (0,4M);
- Solução de diluição = MS-62 + 1,2 M de sacarose

3. Introdução e multiplicação in vitro da espécie em estudo:

Isolar e introduzir in vitro meristemas ou gemas laterais coletadas de plantas em crescimento em campo ou casa de vegetação em meio de introdução, regeneração e multiplicação in vitro. Após 4-6 semanas de cultivo in vitro, repicar plântulas obtidas por meio de segmentos nodais para produzir estoque de plântulas para uso nos experimentos de criopreservação.

4. Cultivo de segmentos nodais das plântulas obtidas in vitro:

Isolar segmentos nodais das plântulas obtidas in vitro, transferir para frasco Magenta contendo 30 ml de meio de cultura para segmentos nodais e cultivar por 14 dias em sala de crescimento nas condições de cultivo padrão.

5. Isolamento e pré-cultivo dos ápices caulinares (AC):

- Isolar ápices caulinares (AC) dos brotos obtidos em meio de multiplicação de segmentos nodais após 14 dias de cultivo. O AC consiste do meristema apical, 2-3 pares de folhas e porção do caule e medir aproximadamente 1 -2 mm. Retirar uma amostra de AC e transferir para meio de introdução, regeneração e multiplicação in vitro para avaliar sua viabilidade após a excisão (controle de explante);
- Transferir AC para placa de Petri contendo 30 ml de meio de pré-cultivo (25 explantes / 30 ml), embrulhar em papel alumínio e colocar na sala de crescimento ou germinador ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) por ± 18 h (pernoite). Retirar uma amostra de AC e transferir para meio de introdução, regeneração e multiplicação in vitro para avaliar sua viabilidade após o pré-cultivo (controle de pré - cultivo).

6. Saturação e vitrificação:

- Após o pré-cultivo, transferir uma amostra de AC para criotubos contendo 2 ml de meio de saturação (25 explantes/criotubo) e deixar repousar por 20 min. Retirar uma amostra de AC e transferir para meio de introdução, regeneração e multiplicação in vitro para avaliar a viabilidade após a saturação (controle de saturação);
- Transferir uma amostra de AC para frasco contendo meio de vitrificação PVS2 (25 explantes/criotubo) por 1 h, à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Terminado esse tempo retirar uma amostra de AC e transferir para meio de introdução, regeneração e multiplicação in vitro para avaliar sua viabilidade após a vitrificação (controle de vitrificação).

7. Congelamento, descongelamento, diluição da PVS2 e regeneração após o congelamento:

- Transferir uma amostra de AC para criotubos contendo 2 ml de PVS2 (10 explantes / criotubo). Inserir os criotubos contendo os AC em cânulas de alumínio e prendê-los firmemente. Mergulhar as cânulas com os criotubos rapidamente em nitrogênio líquido (-196°C , velocidade de congelamento de aproximadamente $-200^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$). Os criotubos devem permanecer mergulhados em NL por no mínimo 1 h antes de se fazer o descongelamento;
- Remover as cânulas do NL e mergulhar rapidamente em banho-maria com água destilada esterilizada ($37^\circ\text{C} - 40^\circ\text{C}$) por 2 min, sob agitação constante;
- Com o auxílio de uma pipeta remover imediatamente a PVS2 do criotubo e substituir por 2 ml do meio de diluição, e deixar repousar por 20 min. Após 10 min drenar o meio de diluição adicionado inicialmente e acrescentar 2 ml desse mesmo meio e deixar repousar por mais 10 min, completando os 20 min do tempo de diluição;

- Inocular AC em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de introdução, regeneração e multiplicação *in vitro*, embrulhar a grade com papel pardo, levar à sala de crescimento e cultivar no escuro por 48 h. Transcorrido esse tempo, desembulhar a grade e cultivar os AC nas condições de iluminação padrão da sala. Nos primeiros 7 dias após a inoculação (DAI) observar os AC diariamente e anotar os resultados no formulário de acompanhamento de experimento. Após 7 DAI observar os AC semanalmente e anotar os resultados no formulário de acompanhamento de experimento. Explantos contaminados devem ser removidos imediatamente e a retirada deve ser registrada no formulário de acompanhamento de experimento.
- Na Figura 3 estão ilustradas as etapas para a criopreservação de estruturas vegetais adotando-se a técnica de vitrificação.

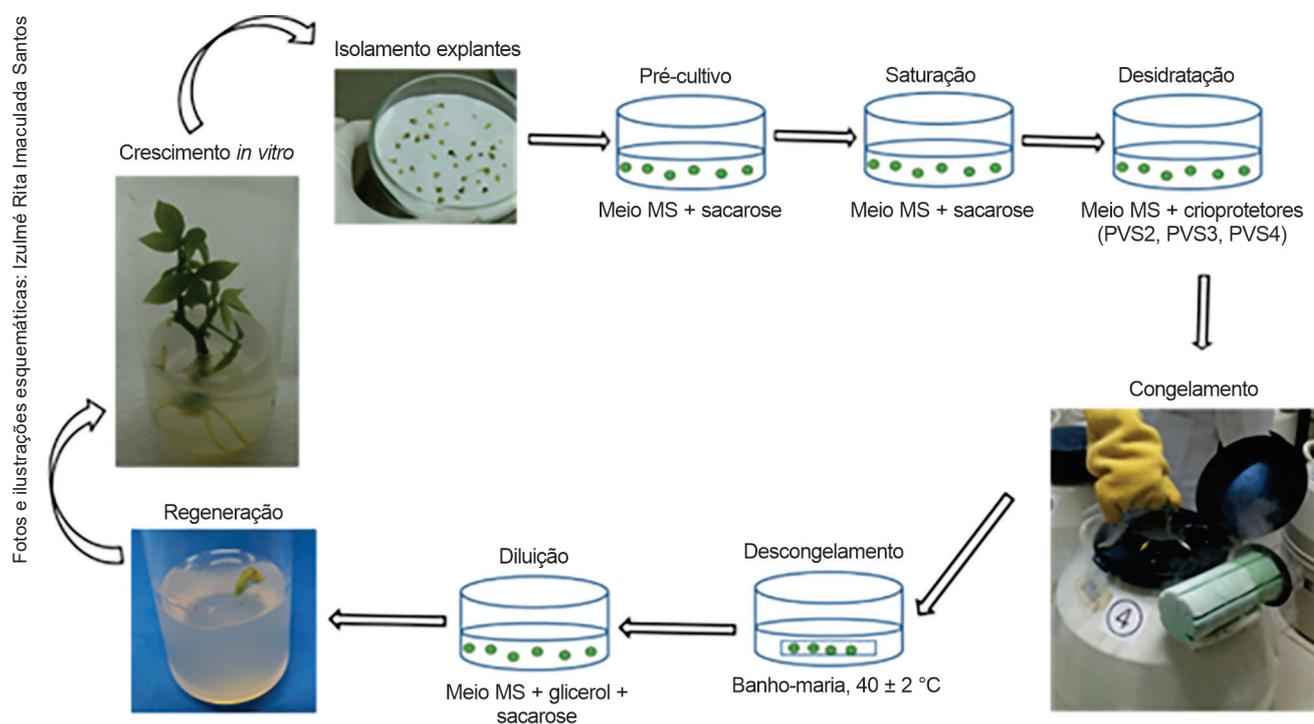


Figura 3. Etapas do procedimento de vitrificação com PVS2.

III. Descrição das etapas do procedimento de vitrificação-gotejamento

1. Materiais necessários:

- Material vegetal: ápices caulinares, gemas laterais, meristemas, eixos embrionários, embriões;
- Instrumentos, utensílios e equipamentos: bisturi, cabine de fluxo laminar, caixa térmica, criotubos, lâminas, papel filtro, peneiras de alumínio, pinças, pipetas plásticas de Pasteur e de vidro, placas de Petri, tiras de papel alumínio, agitador magnético, microscópio estereoscópico, nitrogênio líquido e outros.

2. Meios de cultura e soluções

- Meio de introdução, regeneração e multiplicação *in vitro*
- Meio de cultura para segmentos nodais
- Meio de pré-cultivo = MS-62 líquido + 0,4 M de sacarose

- Meio de saturação = MS-62 líquido + 1,6 M de sacarose + 2,0 M de glicerol
- Meio de vitrificação PVS2 = MS-62 líquido + glicerol (30%) + etilenoglicol (15%) + DMSO (15%) + sacarose (0,4M)
- Meio de diluição = MS-62 + 1,2 M de sacarose

3. Introdução e multiplicação in vitro da espécie em estudo:

Isolar e introduzir in vitro meristemas ou gemas laterais de ramos de plantas da espécie em estudo coletados de plantas em crescimento em campo ou casa de vegetação em meio de introdução, regeneração e multiplicação in vitro. Após 4-6 semanas de cultivo in vitro, repicar plântulas obtidas para produzir estoque de plântulas para uso nos experimentos de criopreservação.

4. Cultivo de segmentos nodais das plântulas obtidas in vitro:

Isolar segmentos nodais das plântulas obtidas in vitro, transferir para frasco Magenta contendo 30 ml de meio de cultura para segmentos nodais e cultivar por 14 dias em sala de crescimento nas condições de cultivo padrão.

5. Isolamento e pré-cultivo dos AC:

- Isolar AC dos brotos obtidos em meio de multiplicação de segmentos nodais após 14 dias de cultivo. O AC consiste do meristema apical, 2-3 pares de folhas e porção do caule e medir aproximadamente 1-2 mm. Retirar uma amostra de AC e transferir para meio de introdução, regeneração e multiplicação in vitro para avaliar sua viabilidade após a excisão (controle de explante).
- Transferir AC para placa de Petri contendo 30 ml de meio de pré-cultivo (25 explantes/30 ml), embrulhar em papel alumínio e colocar na sala de crescimento ou germinador ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) por ± 18 h (pernoite). Retirar uma amostra de AC e transferir para meio de introdução, regeneração e multiplicação in vitro para avaliar sua viabilidade após o pré-cultivo (controle de pré-cultivo).

6. Saturação e vitrificação:

- Após o pré-cultivo, transferir uma amostra de AC para criotubos contendo 2 ml de meio de saturação (25 explantes/criotubo) e deixar repousar por 20 min. Retirar uma amostra de AC e transferir para meio de introdução, regeneração e multiplicação in vitro para avaliar a viabilidade após a saturação (controle de saturação).
- Transferir uma amostra de AC para frasco contendo meio de vitrificação PVS2 (25 explantes/criotubo) por 1 h, à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Terminado esse tempo retirar uma amostra de AC e transferir para meio de introdução, regeneração e multiplicação in vitro para avaliar sua viabilidade após a vitrificação (controle de vitrificação).

7. Congelamento, descongelamento, diluição da PVS2 e viabilidade após o congelamento:

- Para o congelamento, usando uma pipeta dispor 5 gotas de PVS2 sobre tiras de alumínio e sobre cada uma delas colocar um AC. Com auxílio de uma pinça pegar as tiras de alumínio e mergulhar em NL (-196°C , velocidade de congelamento de aproximadamente $-200^\circ\text{C}\cdot\text{min}$.⁻¹) tomando o cuidado de colocá-la dentro da peneira de alumínio colocada na caixa térmica. Deixar as tiras em NL por no mínimo 1 h antes de fazer o descongelamento.

- Para o descongelamento, remover as tiras de alumínio da caixa térmica e mergulhar rapidamente em meio de diluição aquecido para $38\pm 2^{\circ}\text{C}$ e agitar por 2 min. Após esse tempo, remover as tiras de alumínio e drenar o meio de diluição com pipeta.
- Para a regeneração, inocular AC individualmente em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de introdução, regeneração e multiplicação in vitro, embrulhar a grade com papel pardo, levar à sala de crescimento e cultivar no escuro por 48 h. Transcorrido esse tempo, desembulhar a grade e cultivar os AC nas condições de iluminação padrão da sala. Nos primeiros 7 dias após a inoculação (DAI) observar os AC diariamente e anotar os resultados no formulário de acompanhamento de experimento. Após 7 DAI observar os AC semanalmente e anotar os resultados no formulário de acompanhamento de experimento. Explantes contaminados devem ser removidos imediatamente e a retirada deve ser registrada no formulário de acompanhamento de experimento.

Na Figura 4 estão ilustradas as etapas para a criopreservação de estruturas vegetais adotando-se a técnica de vitrificação-gotejamento.



Figura 4. Etapas do procedimento de vitrificação-gotejamento. A: tiras de alumínio esterilizadas em autoclave para onde os explantes serão transferidos; B: transferência de gotas de PVS2 contendo um ápice caulinar; C: tiras de alumínio com gotas de PVS2, cada uma contendo um ápice caulinar, prontas para o congelamento em nitrogênio líquido.; D: submersão de tiras de alumínio contendo ápices em nitrogênio líquido.

3. Encapsulamento-desidratação

Uma alternativa à desidratação celular induzida pelo congelamento antes da imersão em nitrogênio líquido foi proposta por Dereuddre et al. (1990). Esse processo, chamado “encapsulamento-desidratação” (Dereuddre et al., 1990) baseia-se na tecnologia desenvolvida para a produção de sementes artificiais. Explantes são encapsulados em cápsulas de gel de alginato, as quais são então, pré-cultivadas em um meio contendo altos níveis de sacarose, desidratados por exposição ao ar da capela de fluxo laminar ou com sílica gel, diretamente imersos em nitrogênio líquido, e

lentamente descongelados. Desde que Dereuddre et al. (1990) relataram esse procedimento, ele tem sido usado com sucesso para a criopreservação de uma grande variedade de espécies de plantas incluindo algumas que haviam previamente se mostrado intolerantes ao congelamento, como gemas apicais de pereira (Scottet et al., 1992), batata-inglesa (Fabre; Dereuddre, 1990), videira (Plessis et al., 1993) e chicória (Vandenbussche et al., 1993) e embriões somáticos de cenoura (Dereuddre et al., 1991). Encapsulamento-desidratação oferece várias vantagens sobre as técnicas de criopreservação convencionais de congelamento lento, por exemplo, facilidade de manuseio de explantes de dimensões reduzidas, simplificação do meio crioprotetor, eliminação dos caros congeladores programáveis, independência da sobrevivência da velocidade de congelamento, e aumento no tamanho de explantes que sobrevivem à exposição ao nitrogênio líquido (Bachiri et al., 1995). O encapsulamento protege a estrutura embebida e a torna resistente a tratamentos que poderiam ser letais (Paulet et al., 1993).

IV. Descrição das etapas do procedimento de encapsulamento-desidratação

1. Materiais necessários:

- Material vegetal: ápices caulinares, gemas laterais, meristemas, eixos embrionários, embriões;
- Instrumentos, utensílios e equipamentos: bisturi, cabine de fluxo laminar, criotubos, balão de Erlenmeyer, lâminas, papel filtro, pinças, pipetas plásticas de Pasteur e de vidro, placas de Petri, potes de vidro, microscópio estereoscópico, nitrogênio líquido e outros.

2. Meios de cultura e soluções

- Meio de introdução, regeneração e multiplicação in vitro
- Meio de cultura para segmentos nodais
- Meio de pré-cultivo = MS-62 líquido + 0,4 M de sacarose
- Meio de cultura com alginato de sódio = MS líquido + 3% de alginato de sódio
- Meio de cultura com cloreto de cálcio = MS-62 líquido + 0,1 M de cloreto de cálcio.

3. Introdução e multiplicação in vitro da espécie em estudo:

Isolar e introduzir in vitro meristemas, segmentos nodais ou gemas laterais de ramos de plantas da espécie em estudo, coletados de plantas em crescimento em campo ou casa de vegetação, em meio de introdução, regeneração e multiplicação in vitro. Após 4 - 6 semanas de cultivo in vitro, repicar plântulas obtidas para produzir estoque de plântulas para uso nos experimentos de criopreservação.

4. Cultivo de segmentos nodais das plântulas obtidas in vitro:

Isolar segmentos nodais das plântulas obtidas in vitro, transferir para frasco Magenta contendo 30 ml de meio de cultura para segmentos nodais e cultivar por 14 dias em sala de crescimento nas condições de cultivo padrão.

5. Isolamento e pré-cultivo dos AC:

- Isolar AC dos brotos obtidos em meio de multiplicação de segmentos nodais após 14 dias de cultivo. O AC mede aproximadamente 1 - 2 mm e consiste do meristema apical, 2-3 pares de folhas e porção do caule. Durante a excisão transferir os AC para placa de Petri forrada

com 1 – 2 discos de papel filtro umedecido com água destilada esterilizada. Ao término da excisão, retirar uma amostra de AC e transferir para tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de introdução, regeneração e multiplicação in vitro para avaliar a qualidade dos explantes após a excisão (controle de explante);

- Para o pré-cultivo, transferir AC para placa de Petri contendo 30 ml de meio de pré-cultivo (25 explantes / 30 ml), embrulhar em papel alumínio e cultivar em sala de crescimento ou germinador ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) por ± 18 h. Recomenda-se fazer essa transferência ao final do dia, por volta de 15 h, para que o pré-cultivo ocorra no período da noite. Transcorridas 18 h, retirar uma amostra de AC e transferir para meio de introdução, regeneração e multiplicação in vitro para avaliar sua viabilidade após o pré-cultivo (controle de pré - cultivo).

6. Encapsulamento e desidratação:

- Para o encapsulamento, após o pré-cultivo, transferir uma amostra de AC para placas de Petri pequenas contendo 5 ml de meio de cultura com alginato de sódio. Com uma pipeta aspirar os AC com o meio de cultura com alginato de sódio e pingar em frasco de vidro contendo meio de cultura com cloreto de cálcio. Agitar o frasco delicadamente à medida que for pingando as gotas para evitar aderência das cápsulas. Após pingar todos os AC no meio de cultura com cloreto de cálcio aguardar 30 min para permitir a polimerização de todas as cápsulas. Cada cápsula deve conter um único AC. Tomar cuidado durante a aspiração para que não se formem bolhas nas cápsulas.
- Para a desidratação, transferir AC encapsulados para placa de Petri contendo dois discos de papel filtro para absorção do meio de cultura com cloreto de cálcio da superfície das cápsulas. A desidratação poderá ser feita usando sílica gel azul indicadora ou cabine de fluxo laminar. No primeiro caso, transferir cápsulas para recipiente contendo sílica gel azul indicadora, dispostas sobre discos de papel filtro para evitar contato direto das cápsulas com a sílica gel. No segundo caso, dispor as cápsulas sobre placas de Petri invertidas, colocadas a 10 cm do fundo da cabine de fluxo laminar. Em ambos os casos desidratar por períodos de tempo determinados anteriormente por meio de uma curva de desidratação (consultar a ITPL para curva de desidratação). Ao final de cada um dos períodos de desidratação estabelecidos, retirar uma amostra de AC e transferir para meio de introdução, regeneração e multiplicação in vitro para avaliar sua viabilidade (controle de desidratação).

7. Congelamento, descongelamento e regeneração após o congelamento:

- Para o congelamento, transferir os AC desidratados para criotubos, inseri-los nas cânulas, coloca-las em canisters e inseri-los nos criotanques, submergindo-os em NL (-196°C , velocidade de congelamento de aproximadamente $-200^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$). Deixar os AC repousando em NL por no mínimo 1 h antes de fazer o descongelamento.
- Para o descongelamento, remover os canisters do criotanque, remover as cânulas e mergulhá-las rapidamente em banho-maria a $38 \pm 2^\circ\text{C}$ e agitar por 2 min. Após esse tempo, remover os criotubos das cânulas.
- Para a regeneração, inocular AC individualmente em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de introdução, regeneração e multiplicação in vitro, embrulhar a grade com papel pardo, levar à sala de crescimento e cultivar no escuro por 48 h. transcorrido esse tempo, desembulhar a grade e cultivar os AC nas condições de iluminação padrão da sala. Nos primeiros 7 dias após a inoculação (DAI) observar os AC diariamente e anotar os resultados no formulário de acompanhamento de experimento. Após 7 DAI observar os AC semanalmente e anotar os

resultados no formulário de acompanhamento de experimento. Explantes contaminados devem ser removidos imediatamente e a retirada deve ser registrada no formulário de acompanhamento de experimento.

Na Figura 5 estão ilustradas as etapas para a criopreservação de estruturas vegetais adotando-se a técnica de encapsulamento-desidratação.

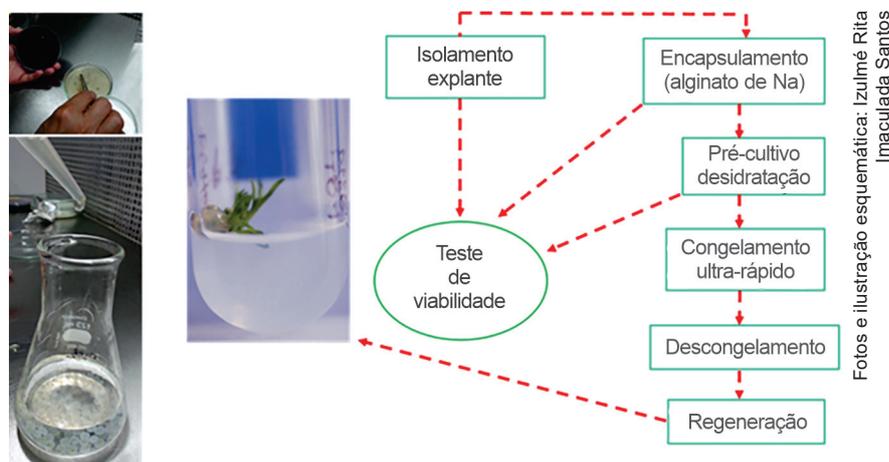


Figura 5. Etapas do procedimento de encapsulamento-desidratação.

V. Descrição das etapas do procedimento de “Cryoplates”

1. Materiais necessários:

- Material vegetal: ápices caulinares, gemas laterais, meristemas, eixos embrionários, embriões;
- Instrumentos/utensílios: bisturi, cabine de fluxo laminar, criotubos, lâminas, papel filtro, pinças, pipetas plásticas de Pasteur e de vidro, placas de Petri, potes de vidro, microscópio estereoscópico, nitrogênio líquido, tiras de alumínio e outros.

2. Meios de cultura e soluções:

- Meio de introdução, regeneração e multiplicação in vitro;
- Meio de cultura para segmentos nodais;
- Meio de pré-cultivo = MS-62 líquido + 0,4 M de sacarose;
- Meio de cultura com alginato de sódio = MS líquido + 2% de alginato de sódio + 0,4M de sacarose;
- Meio de cultura com cloreto de cálcio = MS-62 líquido + 0,1 M de cloreto de cálcio + 0,4M de sacarose;
- Solução de saturação (loading) = MS-62 líquido + 1,6 M de sacarose + 2,0 M de glicerol;
- Solução de vitrificação PVS2 = MS-62 líquido + 30% (w/v) de glicerol + 15% (w/v) de etilenoglicol + 15% (w/v) de DMSO + 0,4M de sacarose;
- Solução de diluição = MS-62 + 1,2 M de sacarose.

3. Introdução e multiplicação in vitro da espécie em estudo:

Isolar e introduzir in vitro meristemas, segmentos nodais ou gemas laterais de ramos de plantas da espécie em estudo, coletados de plantas em crescimento em campo ou casa de vegetação, em meio de introdução, regeneração e multiplicação in vitro. Após 4-6 semanas de cultivo in vitro, repicar plântulas obtidas para produzir estoque de plântulas para uso nos experimentos de criopreservação.

4. Cultivo de segmentos nodais das plântulas obtidas in vitro:

Isolar segmentos nodais das plântulas obtidas in vitro, transferir para frasco Magenta contendo 30 ml de meio de cultura para segmentos nodais e cultivar por 14 dias em sala de crescimento nas condições de cultivo padrão.

5. Isolamento e pré-cultivo dos AC:

- Isolar AC dos brotos obtidos em meio de multiplicação de segmentos nodais após 14 dias de cultivo. O AC mede aproximadamente 1 -2 mm e consiste do meristema apical, 2-3 pares de folhas e porção do caule. Durante a excisão transferir os AC para Placa de Petri forrada com 1 – 2 discos de papel filtro umedecido com água destilada esterilizada. Ao término da excisão, retirar uma amostra de AC e transferir para tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de introdução, regeneração e multiplicação in vitro para avaliar a qualidade dos explantes após a excisão (controle de explante).
- Para o pré-cultivo, transferir AC para placa de Petri contendo 30 ml de meio de pré-cultivo (25 explantes / 30 ml), embrulhar em papel alumínio e cultivar em sala de crescimento ou germinador ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) por ± 18 h. Recomenda-se fazer essa transferência ao final do dia, por volta de 15 h, para que o pré-cultivo ocorra no período da noite. Transcorridas 18 h, retirar uma amostra de AC e transferir para meio de introdução, regeneração e multiplicação in vitro para avaliar sua viabilidade após o pré-cultivo (controle de pré-cultivo).

Na Figura 6 estão ilustradas as etapas para a criopreservação de estruturas vegetais adotando-se a técnica de "cryoplates".



Figura 6. Etapas do procedimento de "Cryoplate".

VI. Descrição das etapas do procedimento de encapsulamento-vitrificação

Executar o procedimento para a técnica "Cryoplate" até o passo cinco e dar continuidade com as seguintes etapas:

6. Polimerização do alginato e vitrificação:

- Após o pré-cultivo, transferir AC para gotas ($\pm 1\mu\text{l}$ cada gota) de meio de cultura com alginato de sódio dispostas em tiras de alumínio, colocando um AC em cada gota. Após distribuir os AC, pingar sobre eles mais uma gota ($\pm 1\mu\text{l}$) do mesmo meio para garantir que cada AC esteja completamente coberto. Em seguida, pingar gotas ($\pm 1\mu\text{l}$ cada gota) de meio de cultura com cloreto de cálcio sobre os AC até que eles estejam completamente cobertos e aguardar 15 min. para permitir a polimerização do alginato de sódio. Cada gota deve conter um único AC.
- Para a vitrificação, transferir as tiras de alumínio com os AC aderidos para um pote de vidro contendo 20 ml de PVS2 para desidratar à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) pelos períodos de tempo determinados anteriormente. Ao final de cada período de desidratação, retirar uma amostra de AC e transferir para meio de introdução, regeneração e multiplicação in vitro para avaliar sua viabilidade (controle de desidratação).

7. Congelamento, descongelamento e regeneração após o congelamento:

- Para o congelamento, transferir as tiras de alumínio com os AC desidratados para criotubos, inseri-los nas cânulas, coloca-las em canisteres e inseri-los nos criotanques, submergindo-os em NL (-196°C , velocidade de congelamento de aproximadamente $-200^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$).

Alternativamente, pode-se fazer o congelamento em caixas térmicas dentro da cabine de fluxo laminar. Para isso, pegar as tiras de alumínio com uma pinça e mergulhar no NL colocado na caixa térmica (-196°C , velocidade de congelamento de aproximadamente $-200^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) tomando o cuidado de colocá-las dentro da peneira de alumínio. Em ambos os casos, deixar os AC repousando em NL por no mínimo 1 h antes de fazer o descongelamento.

- Para o descongelamento, remover os canisteres do criotanque, remover as cânulas e mergulhá-las em recipiente térmico para levar à cabine de fluxo laminar. Na cabine, retirar as cânulas do recipiente térmico, colocar rapidamente, em banho-maria com água esterilizada e aquecida para $38 \pm 2^\circ\text{C}$ e agitar por 2 min. Após esse tempo, remover os criotubos das cânulas e remover as tiras de alumínio dos criotubos.

Se o congelamento foi feito em caixas térmicas, remover as tiras de alumínio da caixa térmica e mergulhar rapidamente em banho-maria com meio de diluição aquecido para $38 \pm 2^\circ\text{C}$ e agitar por 2 min. Após esse tempo, remover as tiras de alumínio e drenar o meio de diluição com pipeta.

- Para a regeneração, inocular AC individualmente em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de introdução, regeneração e multiplicação in vitro, embrulhar a grade com papel pardo, levar à sala de crescimento e cultivar no escuro por 48 h. Após 48 h desembulhar a grade e cultivar os AC nas condições de iluminação padrão da sala. Nos primeiros sete dias após a inoculação (DAI) observar os AC diariamente e anotar os resultados no formulário de acompanhamento de experimento. Após 7 DAI observar os AC semanalmente e anotar os resultados no formulário de acompanhamento de experimento. Explantes contaminados devem ser removidos imediatamente e a retirada deve ser registrada no formulário de acompanhamento de experimento.

Desidratação-congelamento

Apesar dos avanços obtidos nas últimas duas décadas no estabelecimento de protocolos de criopreservação de plantas herbáceas arbustivas e arbóreas, a diversidade e a complexidade de espécies tropicais e de resposta intra e interespecíficas, não permitem que haja um protocolo

de caráter universal (Benson, 2008a; Jenderek; Reed, 2017; Vollmer et al., 2017). Considera-se, contudo, que a técnica de vitrificação, em que há a dessecação do material vegetal seguida de seu rápido congelamento pode ser adotada para várias espécies, ajustando-se a velocidade de descongelamento e as condições de regeneração (Zeliang; Pattanayak, 2012).

Como a desidratação é um fator crítico para a criopreservação, no caso de sementes, recomenda-se que ela seja conduzida de maneira a remover a água livre e não a água de ligação das células e que sejam estabelecidos os limiares inferior e superior, além dos quais, as estruturas celulares sofrem danos irreversíveis. Observa-se que para os mais variados tipos de espécies de sementes: amiláceas, aleuro-amiláceas, oleaginosas, aleuro-oleaginosas e córneas, quando a desidratação é inapropriada os danos mais comuns são perda da compartimentação celular, alterações metabólicas das estruturas fosfolipídicas, da conformação e configuração molecular da água, falência respiratória e da síntese de proteínas, rompimento e perda da integridade das membranas (tonoplasto e plasmalema), alterações na velocidade de absorção de água e comprometimento da regeneração do material, anomalias no sistema radicular, maior ocorrência de processos oxidativos e acúmulo de radicais livres e redução ou inexistência de processos protetores (Benson, 2008b; Santos; Salomão, 2015).

Além da adequação do processo de dessecação das sementes, a taxa/ velocidade de congelamento e descongelamento deve ser ajustada de acordo com espécie em estudo e o material a ser criopreservado. Isso porque, tanto durante o congelamento quanto durante o descongelamento pode ocorrer a formação de cristais de gelo extremamente danosos para as células. Esses cristais induzem o desequilíbrio osmótico, iônico e morfológico celular podendo resultar na morte da célula (González-Arno et al., 2014).

VII. Descrição das etapas do procedimento de desidratação-congelamento

1. Materiais necessários:

- Material vegetal: sementes inteiras;
- Instrumentos, utensílio e equipamentos: balança, bisturi, cabine de fluxo laminar, caixetas tipo “gerbox”, câmara de secagem, canisters, cânulas, cápsulas de alumínio, criotubos, estufa, filme PVC, lâminas, papel filtro, papel germitest, papel mata-borrão, pinças, placas de Petri, potes de vidro, nitrogênio líquido, sacos trifoliados aluminizados (alumínio, polietileno, polipropileno) sílica gel indicador azul, tubo flacon e outros.

2. Soluções:

- Solução de detergente neutro 2% (v/v) usada para assepsia das sementes após beneficiamento e antes dos testes de germinação;
- Solução de hipoclorito de sódio 2% do volume comercial usada para assepsia das sementes após beneficiamento;
- Álcool 70 GL usado para assepsia de recipiente e instrumentos de acondicionamento e manuseio das sementes;
- Água deionizada para pré-umidificação das sementes antes dos testes de germinação.

3. Determinação do teor de água e da germinabilidade iniciais:

- Determinar o teor de água inicial pelo método de estufa 103 ± 2 °C/24 h (Brasil, 2009) após o beneficiamento e calcular os resultados em percentuais médios com base na massa fresca (bmf) das sementes;
- Germinabilidade inicial, antes de avaliá-la dispor as sementes em água deionizada para pré-embrição, por período igual ou superior a 20 min. Conduzir teste de germinação conforme instruções existentes na literatura (Salomão et al, 2019).

4. Congelamento, descongelamento e regeneração com teor de água inicial:

- Para o congelamento, acondicionar as sementes com o teor de água inicial inferior a 15% (bmf) em criotubos ou em sacos trifoliados aluminizados envoltos com filme PVC. Depositar os recipientes com as sementes em canisters e inseri-los nos criotanques, submergindo-os em NL (-196 °C, velocidade de congelamento de aproximadamente -200 °C.min.⁻¹). Deixar o material em NL por no mínimo 24 h antes de fazer o descongelamento;
- Para o descongelamento, remover os canisters do criotanque, remover os recipientes contendo as sementes e deixá-los à temperatura ambiente (25 ± 2 °C por ≥ 4 h);
- Para a regeneração, adotar procedimento descrito na etapa três para germinabilidade.
- Comparar o desempenho germinativo das sementes (percentual germinativo, vigor das plântulas, velocidade de germinação e anormalidades nos sistemas radicular e aéreo) antes e após congelamento.

Outros parâmetros podem ser comparados como, peso de massa fresca e seca das estruturas das plântulas, vazamento de solutos, viabilidade.

5. Desidratação, determinação do teor de água e da germinabilidade

Desidratar as sementes dispondo-as sobre ou entre sílica azul indicadora em recipientes herméticos ou em ambiente refrigerado com temperatura ≤ 21 °C ou em câmara de secagem (20 °C/15% UR) ou em cabine de fluxo laminar. Estabelecer períodos regulares para a retirada de amostras a serem avaliadas. Ao final de cada um dos períodos de desidratação determinar o teor de água e avaliar a germinabilidade (controle de desidratação).

6. Congelamento, descongelamento e regeneração períodos de desidratação:

Após cada período de desidratação, além da determinação do teor de água e da germinabilidade, retirada de amostras para o congelamento em NL repetindo os procedimentos descritos na etapa quatro.

7. Estabelecimento das condições para a criopreservação de sementes ortodoxas:

Os limites inferior e superior de teor de água para a semente em estudo serão estabelecidos em função do desempenho germinativo apresentado pelo material após cada período de dessecação e dessecação seguida de congelamento em NL.

Na Figura 7 estão ilustradas as etapas para a criopreservação de sementes adotando-se a técnica de desidratação-congelamento.

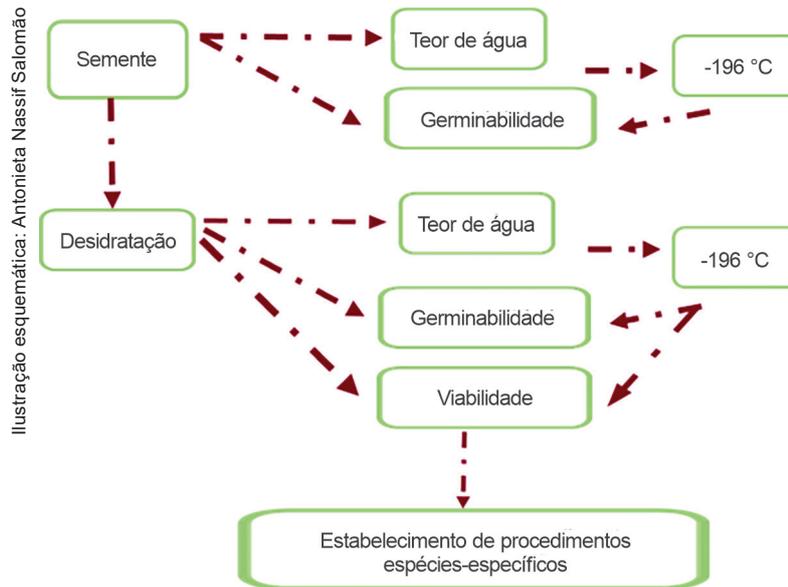


Figura 7. Etapas do procedimento de desidratação-congelamento de sementes ortodoxas.

Fatores que afetam a sobrevivência à criopreservação

A sobrevivência e a regeneração de material criopreservado depende de numerosos fatores tais como tamanho e estágio de desenvolvimento do material, desidratação, congelamento, descongelamento e regeneração. Os vários tecidos de uma planta apresentam diferentes níveis de tolerância à desidratação, e isto resulta em sensibilidade diferente à exposição ao nitrogênio líquido. De modo geral, estruturas de tamanho reduzido são mais apropriadas para o congelamento, uma vez que a desidratação e congelamento ocorrem de forma mais rápida e uniforme em estruturas menores. Material jovem, em estágio meristemático, é mais apropriado porque suas células são pequenas e contêm citoplasma denso com poucos vacúolos (contendo, portanto, pouca água) (Engelmann, 1991). Amostras podem ser coletadas de plantas produzidas in vivo ou in vitro. Material produzido in vitro tem preferência em muitos casos porque os explantes já estão em condição asséptica e podem estar também livres de patógenos.

Desidratação

Os sistemas experimentais usados na criopreservação (calos, embriões zigóticos e somáticos, gemas apicais e laterais, sementes e suspensões celulares) são sistemas hidratados com altos teores de água nas células. Esta água precisa ser removida para evitar injúria causada pela formação de gelo durante o congelamento. A desidratação, no entanto, é uma etapa crítica uma vez que a água tem muitas funções biológicas nas células de organismos vivos. Ela é um importante solvente, meio de transporte, resfriador (através da evaporação), e um constituinte essencial e estabilizador da estrutura das macromoléculas e organelas, a qual é mantido pelas interações hidrofílicas e hidrofóbicas entre elas (Kramer; Boyer, 1995; Vertucci; Farrant, 1995). Quando a água é removida das células, solutos se tornam mais concentrados, possivelmente 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).

Estudos de ultraestrutura de tecidos desidratados revelaram que as membranas celulares são o primeiro local de injúria (Steponkus, 1984). Em seu estado hidratado as membranas celulares

são formadas por uma dupla camada de fosfolípidios que está em um estado cristalino líquido a temperaturas fisiológicas (Crowe et al., 1984; 1988). Estes lipídios podem passar para uma fase de gel à mesma temperatura se a água é removida dos seus grupos polares. Esta transição é completamente reversível após a reidratação. Um tipo de alteração letal e irreversível das membranas em consequência da desidratação é a mudança na sua composição lipídica.

A formação da fase de uma lateral e de uma fase gel é altamente prejudicial para as membranas e para a organização membrana-proteína, contribuindo para a perda das suas funções, tais como permeabilidade, compartimentação e atividade de enzimas ligadas a ela (Crowe et al., 1988). A fase lateral compreende uma etapa em que fosfolípidos, colesterol e proteínas constituintes da membrana, formam domínios isolados e desorganizados (Crowe et al., 1988). Alterações na integridade estrutural e na funcionalidade da membrana induzidas pela desidratação podem ser indicadas pelo vazamento de várias soluções citoplasmáticas (íons, açúcares e proteínas) que ocorre após a reidratação (Becwar et al., 1982; Oliver et al., 1993; Prásil; Zámečník, 1998). Tal vazamento reflete a perda parcial da semipermeabilidade da membrana, sugerindo que a injúria causada pela desidratação está intimamente associada à perda da funcionalidade. A velocidade e extensão do vazamento citoplasmático está positivamente correlacionada ao grau de sensibilidade à desidratação. Isso porque, a desidratação causa alterações na integridade estrutural e funcional da membrana, bem como alterações nas suas propriedades físico-químicas, ocasionando mudanças no comportamento e na composição relativa da membrana com perda parcial da sua semi-permeabilidade (Crowe et al., 1990; 1997). Senaratna et al. (1987) sugerem que durante a desidratação de membranas celulares ocorre a de-esterificação das cadeias acil das partículas de glicerol presentes nas cabeças polares dos fosfolípidios das membranas juntamente com a liberação de produtos de degradação.

Na fase gel as células sujeitas a estresse hídrico perdem turgidez e contraem-se. Em decorrência da contração celular material da membrana pode ser perdido irreversivelmente, comprometendo também a integridade da membrana. Esta contração das membranas pode atingir uma proporção tal que elas se aproximam o suficiente para permitir interações entre as duplas camadas, e eventualmente fusão e/ou transição da fase cristalina líquida para uma fase de gel (reversível) ou para a fase hexagonal (irreversível), levando à perda da compartimentação celular e desorganização irreversível da membrana (Vertucci; Farrant, 1995).

Congelamento

A injúria devido ao congelamento é um processo complexo que envolve uma diversidade de aspectos. Se o congelamento é lento a injúria se deve principalmente à desidratação excessiva ou à formação de gelo dentro das células. Nestes casos ocorrerá rompimento das membranas, concentração de solutos no citoplasma a níveis tóxicos e desnaturação de ácidos nucleicos e membranas. A formação de gelo e as injúrias a ela associadas ocorrem de modo diferente dependendo da espécie de planta, estado de tolerância ao congelamento e as condições de congelamento. Portanto, a morte da célula é causada mais provavelmente por numerosos fatores em vez de um único mecanismo (Sakai; Larcher, 1987). Entretanto, parece ser um consenso geral que a injúria decorrente de congelamento é primariamente uma consequência de alterações na semipermeabilidade ou lises da membrana plasmática, resultando de desidratação induzida pelo congelamento (Steponkus, 1984). Isto é, o dano mais significativo causado pelo congelamento às células vivas está relacionado a déficit hídrico.

A membrana plasmática tem um papel central no comportamento celular durante os ciclos de congelamento/descongelamento. Embora todas as membranas celulares sejam vulneráveis à desestabilização induzida por congelamento, a membrana plasmática é da maior importância porque ela é a principal interface entre o meio extracelular e o citoplasma, agindo como uma barreira semipermeável e permitindo efluxo/influxo de água durante o ciclo de congelamento/descongelamento (Uemura; Steponkus, 1994). A membrana celular também previne a inoculação de gelo extracelular na solução intracelular. Portanto, a sobrevivência da célula durante o ciclo de congelamento/descongelamento é essencialmente uma consequência da estabilidade da membrana plasmática. A crio-estabilidade da membrana celular depende de vários fatores. Por exemplo, tem sido relatado que um aumento na quantidade de crioprotetores endógenos (e.g. açúcares), síntese de determinadas proteínas e alteração na composição lipídica da membrana plasmática durante a aclimação ao frio resultam em aumento da crio-estabilidade das membranas (Uemura; Steponkus, 1994).

Descongelamento

O descongelamento também é uma etapa crítica no desenvolvimento de um protocolo de criopreservação. Durante esta fase pode haver formação de cristais de gelo e, em consequência disto, as células podem ser danificadas pelos mesmos mecanismos já discutidos anteriormente. Estes cristais de gelo prejudiciais podem se formar de duas maneiras. No primeiro caso pelo congelamento da água liberada pela devitrificação, ou seja, a água que estava presente nas células e não se congelou durante a redução da temperatura, mas sofreu vitrificação. Com o aumento da temperatura ocorre devitrificação, liberando água na forma líquida que pode se congelar antes que a temperatura ambiente seja atingida. No segundo caso, cristais de gelo diminutos que possam ter se formado durante o congelamento têm a oportunidade de crescer, devido ao aumento da temperatura, formando cristais grandes, os quais então causam rompimento e morte das células. Na maioria dos casos de descongelamento rápido por imersão em água ou meio de cultura líquido a 35-40°C tem garantido melhores resultados. Nesta faixa de temperatura o descongelamento é rápido o bastante para evitar a fusão de micro-cristais formados no congelamento ou a formação de novos cristais pela água liberada pela devitrificação.

Regeneração

O processo de regeneração ideal é aquele que propicia a recuperação da maior quantidade de células vivas e que induz à formação de uma nova planta. Métodos de avaliação por coloração tais como teste de tetrazólio e de diacetato de fluoresceína têm sido usados para avaliar a viabilidade de tecidos e células congeladas. É oportuno mencionar que estes métodos podem dar informação incorreta sobre a viabilidade. Células podem dar reação de coloração positiva imediatamente depois do descongelamento, mas eventualmente morrem em cultura. Em outros casos, células que foram parcialmente danificadas pelo congelamento e estão em estado de choque dão reação de coloração negativa, mas se recuperam e retomam crescimento após uma fase de repouso (Bajaj, 1995). As células podem também apresentar coloração inadequada quando comparadas com controles, não sendo possível definir sua viabilidade. Portanto, a única evidência inquestionável da viabilidade do material submetido ao congelamento em nitrogênio líquido é a retomada do crescimento e a regeneração de um novo indivíduo.

Métodos para avaliação da viabilidade

Nas Figuras 8 e 9 estão ilustrados os tipos de métodos direto e indireto utilizados para a avaliação da germinabilidade e da viabilidade de diferentes estruturas vegetais submetidas à desidratação e à desidratação seguida de congelamento em condições criogênicas de nitrogênio líquido.

Métodos diretos

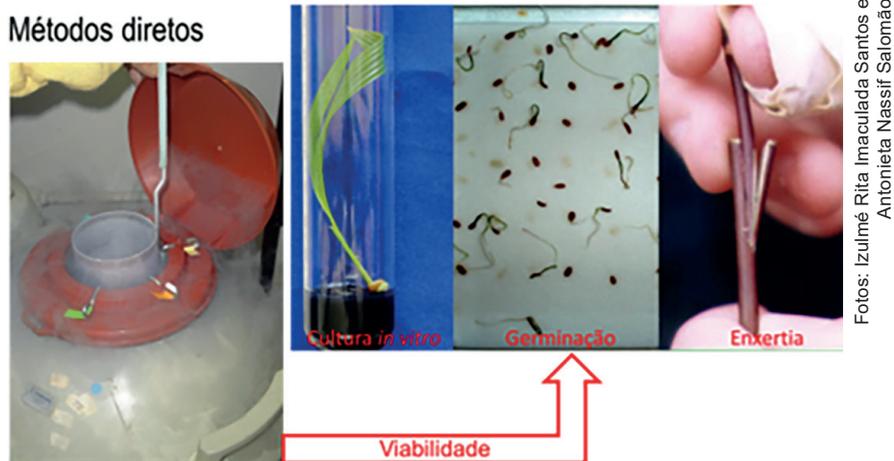


Figura 8. Métodos diretos utilizados para avaliar a viabilidade de material vegetal desidratado e congelado em nitrogênio líquido.

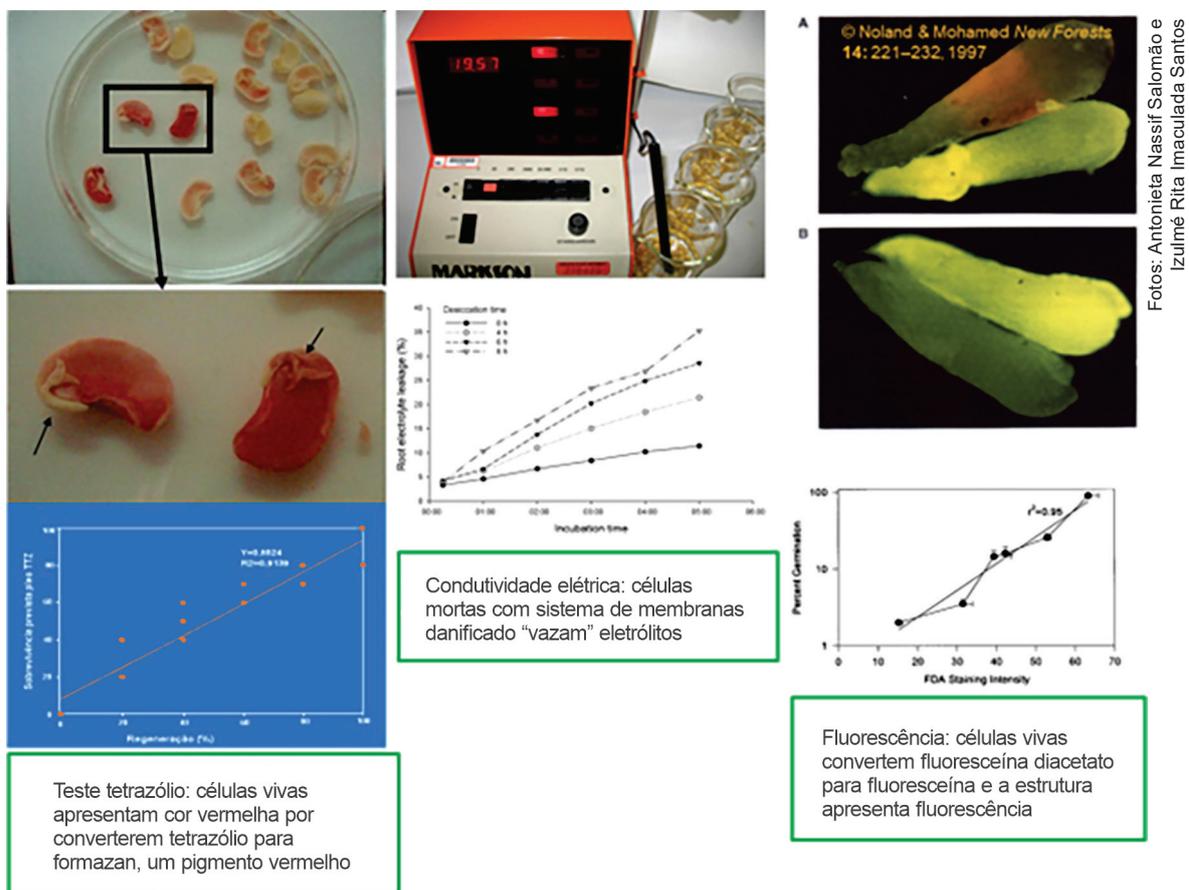


Figura 9. Métodos indiretos utilizados para avaliar a viabilidade de material vegetal desidratado e congelado em nitrogênio líquido.

Resultados alcançados

Os distintos procedimentos descritos acima foram utilizados para o estabelecimento de protocolos para a criopreservação de 247 espécies de uso madeireiro, paisagístico, ornamental, medicinal, alimentício, melífero, forrageiro, ecológico, artesanal, ritualístico e outros (Tabela 1). A regeneração dessas espécies foi feita por meio de germinação de suas sementes (S), em meio de cultura de ápices caulinares (AC) ou eixos embrionários (EE) (Santos et al., 2013).

Tabela 1. Espécies de importância econômica atual ou potencial, com sementes ortodoxas, intermediárias ou recalcitrantes criopreservadas com sucesso.

Família	Gênero	Espécie	Regeneração
Amaranthaceae	<i>Pfaffia</i>	1	S, AC
Anacardiaceae	<i>Anacardium, Astronium, Lithrea, Myracrodruon, Schinopsis, Schinus, Spondias</i>	9	S
Annonaceae	<i>Annona, Rollinia</i>	3	S
Apocynaceae	<i>Aspidosperma</i>	5	S
Araliaceae	<i>Schefflera</i>	1	S
Arecacea	<i>Butia, Euterpe, Syagrus</i>	5	EE
Asteraceae	<i>Lychnophora, Lepidaploa</i>	2	S
Bignoniaceae	<i>Anemopaegma, Callichlamys, Cybistax, Friedericia, Handroanthus, Jacaranda, Mansoa, Pyrostegia, Tabebuia, Zeyheria</i>	15	S
Boraginaceae	<i>Cordia</i>	2	S
Bromeliaceae	<i>Bromelia, Pseudananas</i>	3	S
Burseraceae	<i>Commiphora</i>	1	S
Celastraceae	<i>Maytenus</i>	1	S
Clethraceae	<i>Clethra</i>	1	S
Clusiaceae	<i>Kielmeyera</i>	2	S
Combretaceae	<i>Buchenavia, Terminalia</i>	5	S
Convolvulaceae	<i>Distimake, Ipomoea</i>	3	S
Eriocaulaceae	<i>Syngonanthus</i>	1	S
Euphorbiaceae	<i>Mabea, Manihot</i>	2	S, AC
Fabaceae	<i>Acacia, Aeschynomne, Acosmium, Albizia, Amburana, Adenanthera, Apuleia, Bauhinia, Bowdichia, Canavalia, Cassia, Cenostigma, Centrolobium, Centrosema, Chamaecrista, Clitoria, Copaifera, Cratylia, Crotalaria, Cyclolobium, Dalbergia, Dialium, Dimorphandra, Dioclea, Diplotropis, Dipteryx, Enterolobium, Hymenaea, Leptolobium, Lonchocarpus, Luetzelburgia, Machaerium, Martiodendron, Melanoxylon, Mimosa, Mucuna, Myrocarpus, Myroxylon, Ormosia, Parapiptadenia, Parkia, Peltogyne, Piptadenia, Phithecellobium, Plathymenia, Platypodium, Poeppigia, Pterocarpus Pterodon, Samanea, Sclerolobium, Schizolobium, Senegalia, Senna, Sesbania, Stylosanthes, Stryphnodendron, Tabaroa, Tachigali, Vatairea, Vigna</i>	121	S

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Família	Gênero	Espécie	Regeneração
Gesneriaceae	<i>Sinningia</i>	1	S
Hernandiaceae	<i>Sparattanthelium</i>	1	S
Lamiaceae	<i>Aegiphila, Lantana, Vitex</i>	4	S, AC
Lecythidaceae	<i>Cariniana, Couratari</i>	3	S
Liliaceae	<i>Hippeastrum</i>	1	S
Lythraceae	<i>Diplusodon, Lafoensia, Physocalyma</i>	3	S
Malpighiaceae	<i>Byrsonima</i>	2	S
Malvaceae	<i>Apeiba, Chorisia, Eriotheca, Gossypium, Guazuma, Helicteres, Luehea, Mollia, Pseudobombax, Sterculia, Waltheria</i>	20	S
Meliaceae	<i>Cedrela, Swietenia</i>	3	S
Moraceae	<i>Dorstenia, Fucus</i>	2	S
Myrtaceae	<i>Acca, Psidium</i>	4	S
Passifloraceae	<i>Passiflora</i>	2	S
Polygonaceae	<i>Coccoloba, Triplaris</i>	2	S
Rhamnaceae	<i>Ziziphus</i>	1	S
Rubiaceae	<i>Genipa, Guettarda, Simira, Tocoyena</i>	4	S
Solanaceae	<i>Capsicum</i>	1	S
Sapindaceae	<i>Magonia, Matayba, Sapindus</i>	3	EE, S
Siparunaceae	<i>Siparuna</i>	1	S
Styracaceae	<i>Styrax</i>	1	S
Vochysiaceae	<i>Callisthene, Qualea, Vochysia</i>	4	S
Zingiberaceae	<i>Renealmia</i>	1	S

Conclusões e perspectivas

Estudos realizados nos últimos 30 anos resultaram no desenvolvimento de protocolos de criopreservação de células, tecidos e sementes de uma grande variedade de espécies de plantas. Em muitos casos as técnicas de criopreservação avançaram o suficiente para se poder vislumbrar seu uso imediato em larga escala, em bancos de germoplasma. Entretanto, alguns materiais vegetais ainda se mostram sensíveis ao congelamento, como é o caso das sementes recalcitrantes. A diversidade de resposta entre as diferentes espécies de plantas, ou mesmo entre diferentes tecidos de uma mesma espécie, dificulta sobremaneira a generalização e o desenvolvimento de um protocolo de caráter universal. As pesquisas na área de criobiologia continuam sendo conduzidas em várias partes do mundo para melhorar os conhecimentos dos mecanismos biológicos que controlam a tolerância à desidratação e a sensibilidade ao congelamento e tornar esta técnica mais promissora para maior número de plantas. Estudos biofísicos e bioquímicos têm sido usados para investigar os mecanismos e as causas de injúria induzidos pela criopreservação, resultando em numerosas descobertas fundamentais para aprimorar as técnicas de criopreservação e para superar as dificuldades associadas com as espécies problemáticas. O método de congelamento lento ainda é comumente utilizado para a criopreservação de células em suspensão. As técnicas baseadas na vitrificação e no encapsulamento-desidratação permitiu a sobrevivência de materiais extremamente

sensíveis à desidratação e ao congelamento e aprimorou o processo de criopreservação. Do ponto de vista prático, mais informações sobre os níveis de viabilidade ideais, o tamanho adequado da amostra para cada acesso e a periodicidade de monitoramento são necessários e precisam ser definidos para facilitar a aplicação desta técnica. Da mesma forma, o efeito dos protocolos criogênicos e de regeneração sobre a estabilidade genética do material mantido em nitrogênio líquido precisa ser averiguado. A melhoria no processo de manutenção das cópias de segurança dos Bancos ativos de Germoplasma (BAGs) necessitará a ampliação da utilização da criogenia e técnica de crescimento reduzido *in vitro* no Banco Genético (BGE). Uma delas será o de aumento do número de empregados nas equipes do Laboratório de criobiologia vegetal (LCV) e do Laboratório de cultura de tecidos (LCT) nos BAGs e investimento em infraestrutura do LCT e BAGs. Para estas adaptações serão necessários recursos financeiros independentes ou adicionais? Ou ambos? do previsto para a Vertente vegetal do Portfólio Gestão Estratégica de Recursos Genéticos para a Alimentação, a Agricultura e a Bioindústria. A desvinculação deverá acontecer porque o recurso previsto para este Portfólio não está sendo repassado em sua totalidade, mas principalmente porque a criação de cópias de segurança da maioria dos BAGs não foi prevista no Portfólio que se encontra em andamento. Apesar da importância da manutenção das cópias de segurança de BAGs no Sistema de Curadoria de Germoplasma (SCG) da Embrapa, recomendadas pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), a manutenção desses acessos não dependerá apenas do empenho da equipe do SCG composta de curadores, empregados de laboratórios de criogenia e de cultura de tecidos, mas principalmente de decisões de gestores que se encontram acima da SCG na hierarquia da Embrapa.

Agradecimentos

As autoras desejam expressar seus agradecimentos a Rosângela Caldas Mundim, técnica do Laboratório de Criobiologia Vegetal, por sua colaboração e participação imprescindível em todas as atividades de pesquisa em Criobiologia vegetal desenvolvidas no laboratório ao longo dos anos.

Referências

- BACHIRI, Y.; GAZEAU, C.; HANSZ, J.; MORISSET, C.; DEREUDDRE, J. Successful cryopreservation of suspension cells by encapsulation-dehydration. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 43, p. 241-248, 1995.
- BAJAJ, Y. p. S. Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In: BAJAJ, Y. p. S. (Ed.). **Cryopreservation of plant germplasm I**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p. 3-28. (Biotechnology in agriculture and forestry, 32).
- BECWAR, M. R.; STANWOOD, p. C.; ROOS, E. E. Dehydration effects on imbibitional leakage from desiccation-sensitive seeds. **Plant Physiology**, v. 69, p. 1132-1135, 1982.
- BENSON, E. E. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory and practice. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 27, p. 141-219, 2008a.
- BENSON, E. E. Cryopreservation theory. In: BENSON, B. (Ed.). **Plant cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, 2008b. p. 23-29.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399 p.
- CONSULTATIVE GROUP ON INTERNATIONAL AGRICULTURAL RESEARCH. **People and plants: the development agenda**. Rome, 1993. 12 p.
- CROWE, J. H.; CARPENTER, J. F.; CROWE, L. M.; ANCHORDOGUY, T. J. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. **Cryobiology**, v. 27, p. 219-231, 1990.

- CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; CARPENTER, J. F.; RUDOLPH, A. S.; AURELL WISTROM, C.; SPARGO, B. J.; ANCHORDOGUY, T. J. Interactions of sugars with membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 947, p. 367-384, 1988.
- CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; CHAPMAN, D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. **Science**, v. 223, p. 701-703, 1984.
- CROWE, J. H.; OLIVER, A. E.; HOEKSTRA, F. A.; CROWE, L. M. Stabilization of dry membranes by mixtures of hydroxyethyl starch and glucose: the role of vitrification. **Cryobiology**, v. 35, p. 20-30, 1997.
- DEREUDRE, J.; BLANDIN, S.; HASSEN, N. Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to desiccation and freezing in liquid nitrogen: 1. effects of preculture. **Cryo-Letters**, v. 12, p. 125-134, 1991.
- DEREUDRE, J.; SCOTTEZ, C.; ARNAUD, Y.; DURON, M. Resistance d'apex caulinaires de vitro-plants de Poirier (*Pyrus communis* L. cv. Beurre Hardy), enrobes dans l'alginate, a une deshydratation puis a une congelation dans l'azote liquide: effect d'un durcissement prealable au froid. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 3, n. 310, p. 317-323, 1990.
- DUMET, D.; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y.; DEREUDRE, J. Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-Letters**, v. 14, p. 243-250, 1993.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, v. 4, n. 230, p. 1167-1174, 1990.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? II. Effects of provenance, immaturity, and imbibition on desiccation-tolerance in coffee. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, n. 238, p. 653-657, 1991.
- ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v. 112, p. 9-18, 1997.
- ENGELMANN, F. In vitro conservation of tropical plant germplasm: a review. **Euphytica**, v. 57, p. 227-243, 1991.
- FABRE, J.; DEREUDRE, J. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. **Cryo-Letters**, v. 11, p. 413-426, 1990.
- FAHY, G. M.; MACFARLANE, D. R.; ANGELL, C. A.; MERYMAN, H. T. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v. 21, p. 407-426, 1984.
- FRANKS, F. The properties of aqueous solutions at subzero temperatures. In: _____ (Ed.). **Water: a comprehensive treatise**. New York: Plenum, 1982. p. 215-218.
- GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; MARTINEZ-MONTERO, M. E.; CRUZ-CRUZ, C. A.; ENGELMANN, F. Advances in cryogenic techniques for the long-term preservation of plant biodiversity. In: AHUJA, M. R.; RAMAWAT, K. G. (Ed.). **Biotechnology and Biodiversity**. Heidelberg: Springer, 2014. (Sustainable development and biodiversity, 4). p. 129 -170.
- HIRSH, A. G. Vitrification in plants as a natural form of cryoprotection. **Cryobiology**, v. 24, p. 214-228, 1987.
- HOEKSTRA, F. A.; HAIGH, A. M.; TETTEROO, F. A. A.; VAN ROEKEL, T. Changes in soluble sugars in relation to desiccation tolerance in cauliflower seeds. **Seed Science Research**, v. 4, p. 143-147, 1994.
- IMANISHI, H. T.; SUZUKI, T.; MASUDA, K.; HARADA, T. Accumulation of raffinose and stachyose in shoot apices of *Lonicera caerulea* L. during cold acclimation. **Scientia Horticulturae**, v. 72, p. 255-263, 1998.
- INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES. **Geneflow**: a publication about the earth's plant genetic resources. Rome, 1993. 19 p.
- JENDEREK, M.; REED, B. M. Cryopreserved storage of clonal germplasm in the USDA National Plant Germplasm System. **In vitro Cell and Developmental Biology Plant**, v. 53, p. 299-308, 2017.
- KARTHA, K. K. Meristem culture and germplasm preservation. In: KARTHA, K. K. (Ed.) **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton: CRC, 1985. p. 115-134.
- KOSTER, K. L. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, v. 96, p. 302-304, 1991.
- KRAMER, p. J.; BOYER, J. S. **Water relations of plants and soils**. San Diego: Academic, 1995.

- LEOPOLD, A. C. Coping with desiccation. In: ALSCHER, J. G.; CUMMING, J. R. (Ed.). **Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms**. New York: Wiley-Liss, 1990. p. 37-56.
- LUYET, B. J. The vitrification of organic colloids and of protoplasts. **Biodynamica**, v. 1, n. 29, p. 1-14, 1937.
- MARCO-MEDINA, A.; SERRANO-MARTÍNEZ, F. Crioconservación: herramienta para la conservación ex situ de material vegetal. **Cuadernos de Biodiversidad**, n. 38, p. 9-12, 2012.
- MAZUR, M. L. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. **Journal of Genetics and Physiology**, v. 47, p. 347-369, 1963.
- MAZUR, p. Freezing injury in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 20, p. 419-448, 1969.
- MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- OLIVER, M. J. Desiccation tolerance in vegetative plant cells. **Physiologia Plantarum**, v. 97, p. 779-787, 1996.
- OLIVER, M. J.; MISHLER, B. D.; QUISENBERRY, J. E. Comparative measures of desiccation-tolerance in the *Tortula ruralis* complex. I. Variation in damage control and repair. **American Journal of Botany**, v. 80, n. 2, p. 127-136, 1993.
- PAULET, F.; ENGELMANN, F.; GLAZMANN, J.-C. Cryopreservation of apices of in vitro plantlets of sugarcane (*Sacharum* sp.) hybrids using encapsulation-dehydration. **Plant Cell Reports**, v. 12, p. 525-529, 1993.
- PLESSIS, P.; LEDDET, C.; COLLAS, A.; DEREUDDRE, J. Cryopreservation of *Vitis vinifera* L. cv Chardonnay shoot-tips by encapsulation dehydration: effects of pretreatment, cooling and postculture conditions. **Cryo-Letters**, v. 14, p. 309-320, 1993.
- PRÁŠIL, I.; ZÁMEČNIK, J. The use of a conductivity measurement method for assessing freezing injury. I. Influence of leakage time, segment number, size and shape in a sample on evaluation of the degree of injury. **Environmental and Experimental Botany**, v. 40, p. 1-10, 1998.
- ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v. 1, p. 499-514, 1973.
- ROBERTS, E. H.; ELLIS, R. H. Water and seed survival. **Annals of Botany**, v. 63, p. 39-52, 1989.
- SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: BAJAJ, Y. p. S. (Ed.). **Cryopreservation of plant germplasm** I. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p. 53-69. (Biotechnology in agriculture and forestry, 32).
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 30-33, 1990.
- SAKAI, A.; LARCHER, W. **Frost survival of plants: responses and adaptation to freezing stress**. Berlin: Springer-Verlag, 1987.
- SAKAI, A.; YOSHIDA, S. The role of sugar and related compounds in variations of freezing resistance. **Cryobiology**, v. 5, p. 160-174, 1968.
- SALOMÃO, A. N.; SANTOS, I. R. I. **Criopreservação de germoplasma de espécies frutíferas nativas**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2018. 28 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 361).
- SALOMÃO, A. N.; SANTOS, R. S. dos; CURTI, C. da S. **Conservação de germoplasma semente de espécies nativas**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019. 46 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 367).
- SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N. Avanços na tecnologia de criopreservação de recursos genéticos vegetais. In: VEIGA, R. F. de A.; QUEIROZ, M. A. de. (Ed.). **Recursos fitogenéticos: a base da agricultura sustentável no Brasil**. Viçosa, MG: UFV, 2015. p. 242-247.
- SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N.; VARGAS, D. P.; SILVA, D. p. C.; NOGUEIRA, G. F.; CARVALHO, M. A. F.; PAIVA, R. Situación actual y perspectivas de la investigación en crioconservación de recursos fitogenéticos en Brasil. In: GONZÁLEZ-ARNAO, T.; ENGELMANN, F. (Ed.). **Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe**. San José, Costa Rica: IICA, 2013. p. 75-92.
- SCOTTEZ, C.; CHEVREAU, E.; GODARD, N.; ARNAUD, Y.; DURON, M.; DEREUDDRE, J. Cryopreservation of cold-acclimated shoot tips of pear in vitro cultures after encapsulation-dehydration. **Cryobiology**, v. 29, p. 691-700, 1992.

SENARATNA, T.; MCKERSIE, B. D.; BOROCHOV, A. Desiccation and free radical mediated changes in plant membranes. **Journal of Experimental Botany**, v. 38, p. 2005-2014, 1987.

STEPONKUS, p. L. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35, p. 543-584, 1984.

STEPONKUS, p. L.; WEBB, M. S. Freeze-induced dehydration and membrane destabilization in plants. In: SOMERO, G. N.; OSMOND, C. B.; BOLIS, C. L. (Ed.). **Water and life: comparative analysis of water relationships at the organismic, cellular and molecular level**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. p. 338-362.

STUSHNOFF, C. Cryopreservation of apple genetic resources. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 67, p. 1151-1154, 1987.

STUSHNOFF, C.; REMMELE JUNIOR, R. L.; ESSENSEE, V.; MCNEIL, M. Low temperature induced biochemical mechanisms: implications for cold acclimation and de-acclimation. In: JACKSON, M. B.; BLACK, C. R. (Ed.). **Interacting stresses on plants in a changing climate**. Berlin: Springer-Verlag, 1993. p. 647-657. (NATO ASI Series, 116).

STUSHNOFF, C.; SEUFFERHELD, M. Cryopreservation of Apple (*Malus species*) Genetic Resources. In: BAJAJ, Y. p. S. (Ed.). **Cryopreservation of plant germplasm I**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p. 87-101. (Biotechnology in agriculture and forestry, 32).

UEMURA, M.; STEPONKUS, p. L. A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance. **Plant Physiology**, v. 104, p. 479-496, 1994.

VANDEBUSSCHE, B.; DEMEULEMEESTER, M. A. C.; DE PROFT, M. p. Cryopreservation of alginate-coated in vitro grown shoot-tips of chicory (*Cichorium intybus* L.) using rapid freezing. **Cryo-Letters**, v. 14, p. 259-266, 1993.

VERTUCCI, C. W.; FARRANT, J. M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 237-271.

VILLALOBOS, v. M.; FERREIRA, P.; MORA, A. The use of biotechnology in the conservation of tropical germplasm. **Biotechnology Advances**, v. 9, p. 197-215, 1991.

VOLLMER, R.; VILLAGARAY, R.; CÁRDENAS, J.; CASTRO, M.; CHÁVEZ, O.; ANGLIN, N. L.; ELLIS, D. A large-scale viability assessment of the potato cryobank at the International Potato Center (CIP). **In vitro Cell and Developmental Biology Plant**, v. 53, p. 309-317, 2017.

YONGJIE, W.; ENGELMANN, F.; FRATTARELLI, A.; DAMIANO, C.; WITHERS, L. A. Cryopreservation of strawberry cell suspension cultures. **Cryo-Letters**, v. 18, p. 317-324, 1997.

ZELIANG, p. K.; PATTANAYAK, A. Fundamental cryobiology and basic physical, thermodynamical and chemical aspects of plant tissue cryopreservation. In: ABDURAKHMONOV, I. Y. (Ed.). **Plant breeding**. Rijeka, Croatia: InTech, 2012. p. 41-56.



*Recursos Genéticos
e Biotecnologia*