

**CRIOPRESERVAÇÃO DE EIXOS EMBRIONÁRIOS DE
ESPÉCIES
DE *CITRUS* USANDO ENCAPSULAMENTO E
DESIDRATAÇÃO**

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

José Amauri Dimázio
Presidente

Clayton Campanhola
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Dietrich Gerhard Quast
Sérgio Fausto
Urbano Campos Ribeiral
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Clayton Campanhola
Diretor-Presidente

Gustavo Kauark Chianca
Herbert Cavalcante de Lima
Mariza Marilena T. Luz Barbosa
Diretores-Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe -Geral

Maurício Antonio Lopes
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado
Chefe-adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes
Chefe-Adjunto de Administração

DOCUMENTOS 115

CRIOPRESERVAÇÃO DE EIXOS EMBRIONÁRIOS DE ESPÉCIES DE *CITRUS* USANDO ENCAPSULAMENTO E DESIDRATAÇÃO

Izulmé R. I. Santos

Brasília, DF

2004

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria Alice Bianchi

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Alice Bianchi e Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2004): 150 unidades

S 237 Santos, Izulmé R. I.

Criopreservação de eixos embrionários de espécies de *Citrus* usando encapsulamento e desidratação / Izulmé R. I. Santos. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004.

23 p. – (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 0102-0110; 115)

1. Citrus. 2. Criopreservação. 3. Eixos embrionários. 4. Conservação de germoplasma. I. Título. II. Série.

CDD 634.304

Autor**Izulmé R. I. Santos**

CENARGEN (EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia), CP 02372, CEP 70849-970, Brasília-DF, Brasil. *Corresponding author - Tel.: 55-61-448-4607; Fax: 55-61-340-3426; E-mail: izulme@cenargen.embrapa.br

SUMÁRIO

Resumo	1
Introdução	2
Materiais e Métodos	4
Resultados e Discussão	6
Referências	15

Resumo

Eixos embrionários de três espécies de *Citrus* (*Citrus sinensis* [L.] Osb., *Citrus limon* L., *Citrus reticulata* Blanco) foram criopreservadas com sucesso usando o método de encapsulamento-desidratação. Os eixos embrionários das três espécies foram encapsulados em gel de alginato de sódio, pré-cultivados com sacarose e desidratados para vários teores de umidade antes da criopreservação. Eixos de *C. sinensis* desidratados para $0.15 \text{ g H}_2\text{O.g}^{-1}$ peso seco apresentaram 70% de germinação após o congelamento por 24 horas. Eixos pré-cultivados com sacarose (aumento gradual de 0.5 para 0.75 M) e desidratados pelo mesmo período de tempo continham $0.25 \text{ g H}_2\text{O.g}^{-1}$ peso seco e exibiram 60% de germinação. Acima de 80% de germinação de eixos de *C. sinensis* e *C. reticulata* foi obtido quando glicerol, com ou sem prolina, foi adicionado ao meio de pré-cultivo. A mais alta porcentagem de germinação de eixos de *C. limon* (63%), foi observada quando eixos foram pré-cultivados em meio contendo 0.8 M de sacarose mais 0.5 M de glicerol e subsequentemente desidratados para aproximadamente $0.15 \text{ g H}_2\text{O.g}^{-1}$ peso seco antes da imersão direta em nitrogênio líquido. Apenas 23% de germinação foi obtida para eixos de *C. reticulata* pré-cultivados apenas com sacarose, mas eixos pré-cultivados com sacarose combinada com prolina e glicerol, apresentaram um aumento de três vezes na germinação (87%). Após a criopreservação, os eixos viáveis produziram plântulas normais, sem a formação de calos, dentro de três semanas de cultivo *in vitro*.

Palavras chave – *Citrus*, criopreservação, eixos embrionários, conservação de germoplasma.

Introdução

Citrus são plantas pertencentes à família Rutaceae, cultivadas para a produção de frutos. Atualmente, a conservação do germoplasma dessas valiosas espécies se faz pela manutenção de bancos a campo (Duran-Vila, 1995). Esta abordagem apresenta limitações, principalmente alto custo de manutenção das coleções e a susceptibilidade do material a desastres climáticos e biológicos, sendo portanto uma solução temporária para um problema que requer medidas satisfatórias em longo prazo (Duran-Vila, 1995; Stushnoff & Seufferheld, 1995).

Sementes são geralmente usadas para o armazenamento em longo prazo de germoplasma vegetal, desde que elas sejam ortodoxas, ou seja, tolerem o armazenamento em condições convencionais (5% de umidade e -18°C) sem perda da viabilidade (Roberts, 1973). A conservação de sementes não pode ser usada para sementes de *C. sinensis* [L.] Osb. porque elas são classificadas como intermediárias (Ellis *et al.*, 1990, 1991). Sementes intermediárias são sensíveis à desidratação e temperaturas subzero, mostrando perda de viabilidade consistente ao longo do período de armazenamento (Hong & Ellis, 1995). Assim, uma técnica eficiente de conservação em longo prazo precisa ser desenvolvida para essa espécie.

A criopreservação de material biológico usando nitrogênio líquido (-196°C) tem grande potencial para o armazenamento em longo prazo de germoplasma vegetal, desde que sejam desenvolvidos protocolos que protejam os tecidos de injúria causada por desidratação e exposição a temperaturas ultrabaixas, e permitam a regeneração de material geneticamente estável. À temperatura do nitrogênio líquido, a energia cinética molecular é extremamente baixa e a difusão é extremamente lenta. Sob essas condições, as reações metabólicas ocorrem muito lentamente ou são totalmente paralisadas, e assim a variabilidade genética e a deterioração do material armazenado são virtualmente inexistentes. Portanto, a longevidade do armazenamento é extremamente longa e a estabilidade genética é muito alta. Além disso, o armazenamento em um banco criogênico custa mais barato que outros sistemas disponíveis.

A criopreservação já foi aplicada a vários tecidos de *Citrus*. Óvulos, embriões somáticos e zigóticos, células nucelares e calos sobreviveram ao congelamento em

nitrogênio líquido após terem sido submetidos a vitrificação usando crioprotetores químicos tais como DMSO, etileno glicol, propileno glicol, etc. (Mumford & Grout, 1979; Marin & Duran-Vila, 1988; Kobayashi *et al.*, 1990; Sakai *et al.*, 1990, 1991; Radhamani & Chandel, 1992; Marin *et al.*, 1993). Entretanto, o ideal é o desenvolvimento de protocolos de criopreservação que não dependam desses crioprotetores químicos para a sobrevivência do explante porque eles podem ser tóxicos para as células vegetais, complicam o procedimento de congelamento e em muitos casos não causam um aumento realmente significativo na porcentagem de regeneração (Arakawa *et al.*, 1990). Adicionalmente, o material vegetal usado nesses estudos já realizados (cultura de óvulos, embriões somáticos, suspensões celulares e cultura de calos) não são os mais adequados para a conservação de germoplasma vegetal, particularmente de espécies arbóreas, devido ao risco de variação somaclonal associado com esses métodos (Karp, 1991) e devido ao longo período de tempo necessário para se obter plantas maduras, aptas à reprodução a partir desses sistemas.

Por outro lado, o método de encapsulamento-desidratação usa sacarose como crioprotetor combinado com a desidratação parcial antes da exposição ao nitrogênio líquido, evitando assim o uso de crioprotetores químicos. Além disso, embriões zigóticos são sistemas altamente organizados, que podem ser usados para produzir uma planta inteira a partir de tecidos meristemáticos nele contidos. Assim, esse método implica em um menor risco de promoção de variação somaclonal quando comparado com os outros métodos de regeneração *in vitro* mencionados acima. Adicionalmente, o cultivo de embriões zigóticos tem sido usado com sucesso para criopreservar o germoplasma de muitas espécies de plantas que apresentam sementes recalcitrantes ou intermediárias (Berjak *et al.*, 2000; Pence, 1990).

Os principais objetivos desse trabalho foram (i) estudar os parâmetros básicos envolvidos no desenvolvimento de um protocolo de criopreservação para eixos embrionários de *C. sinensis*, tais como conteúdo de umidade, velocidade de congelamento e descongelamento, para se obter a máxima sobrevivência dos eixos congelados em nitrogênio líquido e (ii) desenvolver um protocolo simples e eficiente para criopreservação de eixos embrionários de *C. sinensis* [L.] Osb. (laranja doce cv. 'Pineapple') usando o encapsulamento-desidratação. Eixos embrionários de *C.*

reticulata Blanco (tangerina) e *C. limon* L.(limão) foram usados para testar o protocolo desenvolvido para eixos de *C. sinensis*. Estes estudos foram baseados na hipótese de que os tecidos vegetais podem ser estabilizados para tolerar a injúria causada pela perda da água livre usando o encapsulamento e a sacarose como um crioprotetor. Combinou-se o encapsulamento, pré-tratamento com sacarose e desidratação controlada para desenvolver um procedimento eficiente de criopreservação para eixos embrionários dessas três espécies de *Citrus*.

Materiais e Métodos

Material vegetal e procedimento para excisão de eixos embrionários

Frutos de *Citrus sinensis* [L.] Osb. e de *C. limon* e *C. reticulata* foram comprados em supermercado. Os frutos recebidos no laboratório foram armazenados imediatamente em uma câmara de crescimento a $15\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante o período de duração dos experimentos. Antes da excisão dos eixos embrionários, a superfície dos frutos foi desinfestada com uma solução 10% (v/v) de hipoclorito de sódio comercial contendo 4-5 gotas de Tween 20 por 15 minutos e enxaguadas 3-4 vezes com água destilada esterilizada. As sementes foram extraídas dos frutos e os eixos embrionários foram isolados de sementes sob microscópio estereoscópico, na capela de fluxo laminar. Eixos embrionários foram transferidos para placas de Petri, sobre papel filtro umedecido (por período de tempo não superior a três horas) até serem utilizados nas etapas seguintes do experimento.

Encapsulamento, pré-tratamento e desidratação das cápsulas

O encapsulamento dos eixos embrionários em gel de alginato foi feito transferindo os eixos isolados para uma solução 3% alginato de sódio (Sigma) e em seguida mergulhando-os em uma solução 0.1 M de CaCl_2 . As cápsulas contendo um eixo cada foram submetidas a dois tipos de pré-tratamento. O primeiro consistiu de pré-cultivo em meio MS líquido (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com sacarose 0.5M e 0.75 M, 24h em cada. O segundo foi o pré-cultivo em meio MS líquido contendo sacarose (0.8 M) mais 0.5 M de glicerol ou 0.8 M de sacarose mais 0.5 M de glicerol e

0.045 M de prolina, 16 horas em cada. Durante o pré-tratamento, as cápsulas foram mantidas à temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$), no escuro, sob agitação (100 rpm) em um shaker horizontal. Lotes de 10 cápsulas pré-tratadas foram desidratadas sobre sílica gel (85 g) dentro de um container hermeticamente fechado (500 mL de capacidade) por 0-8 horas, à temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$). O conteúdo de umidade foi determinado após a secagem em estufa a 80°C por 5 dias ao final de cada período de desidratação. O conteúdo de umidade é expresso com base em peso seco, isto é, $\text{g H}_2\text{O.g peso seco}^{-1}$.

Congelamento e descongelamento dos eixos embrionários

Após cada período de desidratação, as cápsulas foram transferidas para criotubos com 2.0 ml de capacidade (10 eixos/frasco servindo como uma unidade experimental) os quais foram mergulhados em nitrogênio líquido e mantidos a -196°C por pelo menos 60 min. Foram utilizadas três repetições por tratamento distribuído aleatoriamente. Os eixos foram descongelados mergulhando os criotubos em banho Maria a $40\pm 2^{\circ}\text{C}$, sob agitação, por 3 min. Os eixos foram imediatamente transferidos para o meio de regeneração. A viabilidade após a desidratação e a criopreservação foi determinada transferindo as cápsulas para frascos contendo meio MS básico solidificado com 0.7% de ágar. Os eixos encapsulados foram cultivados em câmara de crescimento a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de escuro e $62 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa.

Avaliação da viabilidade

A viabilidade foi avaliada semanalmente e os dados foram registrados após quatro semanas de cultivo e expressos como porcentagem de eixos que produziram plântulas normais, isto é, com raiz e caule. Após seis meses de cultivo, 10 plantas obtidas de cada tratamento foram transplantadas para vasos (500 mL de capacidade) para aclimação. As plantas foram cobertas com sacos plásticos transparentes para evitar desidratação excessiva. Após sete dias, os sacos plásticos foram removidos e as plantas foram transferidas para a casa de vegetação a $25\pm 5^{\circ}\text{C}$ de temperatura e um

fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas de escuro obtido por luminosidade natural ou por iluminação artificial.

Análise estatística

Todos os dados percentuais foram transformados usando arcoseno antes da análise estatística. Os dados nas figuras são os valores percentuais reais. A correlação entre encapsulamento, pré-tratamento com sacarose e desidratação com a sobrevivência dos eixos foram analisados por regressão logística.

Resultados e Discussão

Os controles (eixos embrionários sem tratamento algum) apresentaram 90 a 100% de germinação quando cultivados em meio de regeneração, produzindo plântulas normais, isto é, plântulas com raízes e plúmulas com um ou dois pares de folhas, em 14 dias, sem a formação intermediária de calos. A possibilidade de variação somaclonal é maior quando a regeneração se dá com uma fase intermediária de calo (Fourré *et al.*, 1997; Karp, 1991). Uma vez que o objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de um protocolo para a conservação em longo prazo de germoplasma de citros, procurou-se evitar procedimentos que pudessem causar qualquer tipo de variabilidade genética ao material.

A germinação dos eixos embrionários não foi afetada pelo encapsulamento, permanecendo por volta de 100%. Acredita-se que o encapsulamento protege a estrutura contida na cápsula e a torna resistente a tratamentos que poderiam ser letais (Paulet *et al.*, 1993). Existem evidências de que o encapsulamento pode em muitos casos aumentar o crescimento da estrutura encapsulada. Mathur *et al.* (1989) relataram que ápices caulinares de *Valeriana wallichii* DC apresentaram melhor crescimento e atingiram a fase de aclimação em metade do tempo requerido pelos controle não encapsulados. Da mesma forma, Draget *et al.* (1988) relataram que o tempo requerido para a regeneração de plantas a partir de protoplastos de *Brassica napus* encapsulados em alginato de cálcio foi reduzido à metade quando comparado com protoplastos não encapsulados cultivados em suspensão. De acordo com Fabre &

Dereuddre (1990), o aumento na taxa de desenvolvimento se deve a uma maior disponibilidade de sais minerais e reguladores de crescimento no ambiente em volta da estrutura contida na cápsula. A remoção dos eixos de dentro das cápsulas não é necessária uma vez que os eixos em crescimento são capazes de romper a cápsula à medida que crescem.

Resposta à desidratação

Cápsulas contendo um único eixo embrionário, totalmente hidratadas e não tratadas com sacarose, apresentaram em média $14.6 \text{ g H}_2\text{O.g}^{-1}$ peso seco (Figura 1). Já aquelas pré-tratadas com sacarose apresentaram conteúdo de umidade muito menor (cerca de 2.85 g.g^{-1}) antes da desidratação (Figura 2), provavelmente porque a sacarose remove água das cápsulas por meio de desidratação osmótica. Um decréscimo similar em conteúdo de umidade devido ao pré-tratamento com sacarose foi observado em ápices de *Solanum* sp e meristemas de *Musa* sp (Fabre & Dereuddre, 1990; Panis *et al.*, 1996).

O conteúdo de água das cápsulas pré-tratadas e sem pré-tratamento diminuiu rapidamente dentro das primeiras duas horas de desidratação, e continuou diminuindo lentamente durante as oito horas de desidratação sobre sílica gel (Figuras 1 e 2). A porcentagem de sobrevivência à desidratação para diferentes teores de umidade de eixos pré-tratados ou não com sacarose, e à desidratação seguida de criopreservação estão nas figuras 1 e 2. A viabilidade de eixos que foram encapsulados mas não pré-cultivados com sacarose diminuiu regularmente durante o período de desidratação (Figura 1), indicando que o encapsulamento sozinho não melhorou a tolerância à desidratação dos eixos. O pré-tratamento com sacarose estabilizou a viabilidade dos eixos em cerca de 70% após a desidratação por seis horas (Figura 2). Esta estabilização é intrigante e mais estudos sobre os mecanismos da absorção da sacarose e o papel que ela tem na aquisição da tolerância à desidratação devem ser conduzidos para se obter uma explicação clara a esta observação.

Resposta a criopreservação.

Eixos encapsulados, não tratados com sacarose, totalmente hidratados não sobreviveram à exposição ao nitrogênio líquido (Figura 1). A sobrevivência aumentou significativamente depois que as cápsulas foram desidratadas. A mais alta sobrevivência após a criopreservação (70%) foi obtida para eixos encapsulados, não pré-tratados, que apresentaram conteúdo de água de $0.17 \text{ g H}_2\text{O}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco (Figura 1).

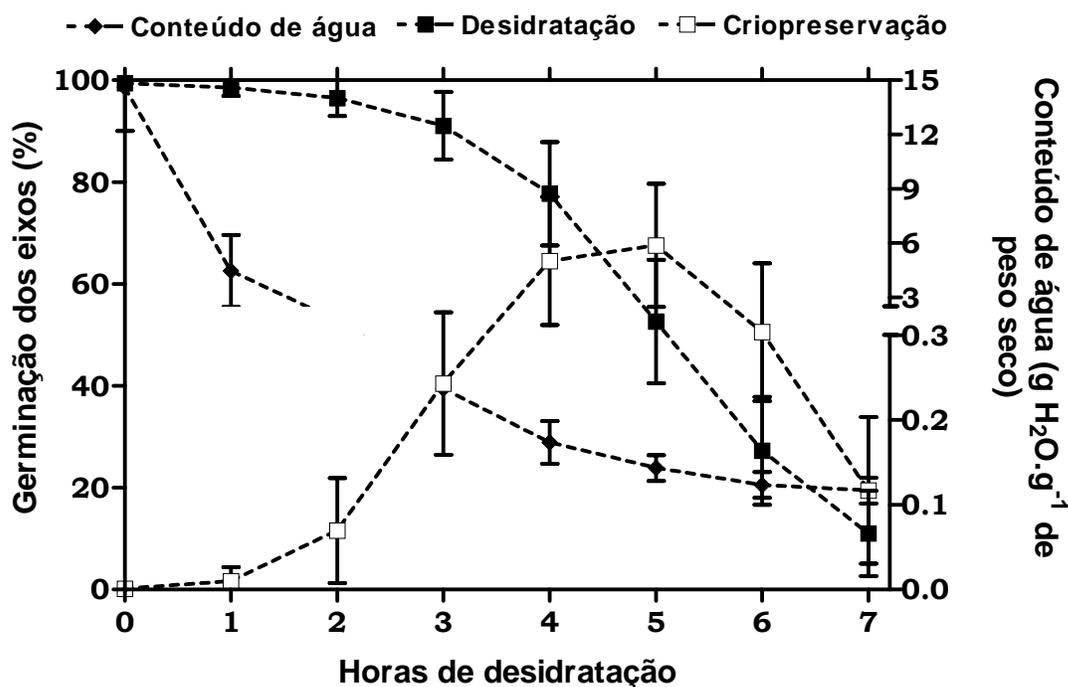


Figura 1: Efeito da duração da desidratação sobre o conteúdo de água (\blacklozenge), a germinação após a desidratação (\blacksquare), ou desidratação seguida de criopreservação (\square). Eixos embrionários de *C. sinensis* foram encapsulados em gel de alginato de sódio, mas não receberam tratamento com sacarose, antes da desidratação sobre sílica gel por vários períodos de tempo. O conteúdo de água inicial das cápsulas foi $14.6 \text{ g H}_2\text{O}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco. Barras verticais representam as médias de três repetições \pm SEM ($P < 0.0001$).

A desidratação melhorou a tolerância ao congelamento de eixos pré-tratados também. Como mostrado na figura 2, eixos encapsulados, pré-cultivados e desidratados apresentaram melhor sobrevivência a teores de umidade mais baixos e mais altos que os eixos não tratados. Os melhores resultados de sobrevivência (60%) foram obtidos com cápsulas com conteúdo de água de 0.30 a $0.25 \text{ g H}_2\text{O}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso

seco. Esses resultados indicam que o pré-cultivo com sacarose conferiu crioproteção a eixos altamente hidratados ($0.72\text{-}2.85\text{ g H}_2\text{O}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco) mas que àqueles com teores de umidade mais baixos ($0.20\text{ - }0.22\text{ g H}_2\text{O}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco) a sacarose aumentou a tolerância à desidratação (Figura 2).

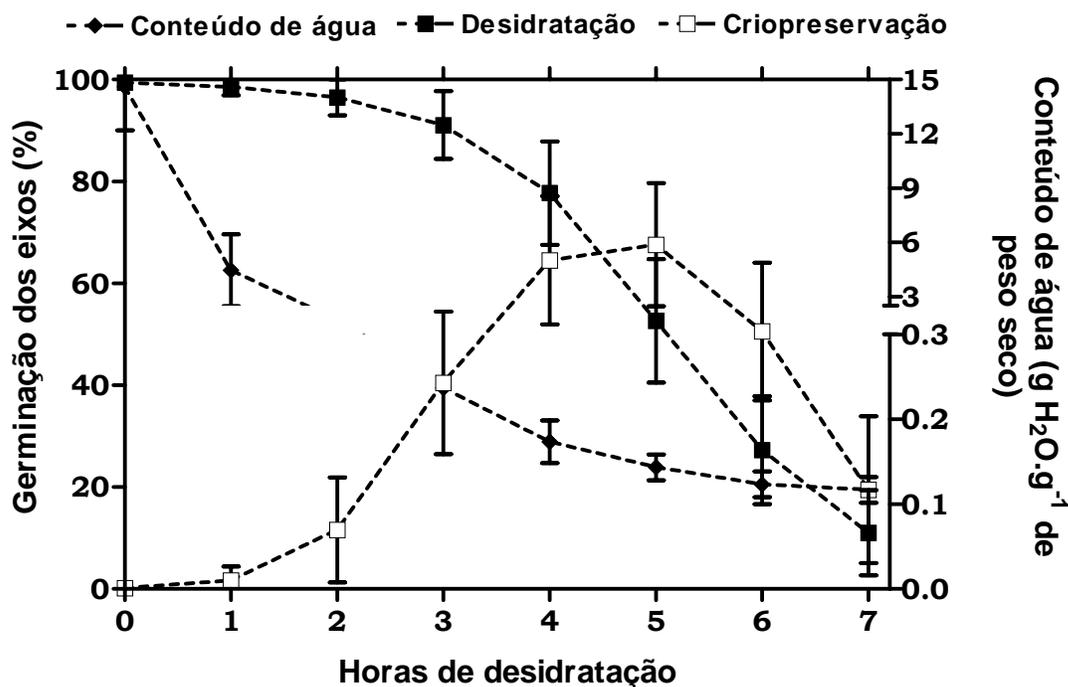


Figura 2: Efeito da duração da desidratação sobre o conteúdo de água (\blacklozenge) e germinação dos eixos após a desidratação (\blacksquare), e desidratação seguida de criopreservação (\square). Eixos embrionários de *C. sinensis* foram encapsulados em gel de alginato de sódio antes do pré-tratamento com 0.5 e 0.75M de sacarose, 24 horas em cada. O conteúdo de água nas cápsulas após o pré-cultivo foi de $2.85\text{ gH}_2\text{O}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco. As barras verticais representam as médias de três repetições \pm SEM ($P<0.001$).

Um efeito similar de aumento da tolerância à desidratação e à temperatura do nitrogênio líquido para tecidos pré-cultivados com altos teores de açúcares, especialmente com sacarose, tem sido observado para outras espécies de planta (Paulet *et al.*, 1993; Stushnoff & Seufferheld, 1995). Inicialmente, acreditava-se que o efeito protetor dos açúcares fosse devido a um efeito osmótico apenas, porém mais recentemente foi observado, direta e indiretamente, que os açúcares entram nas células em grande quantidade (Dumet *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1997). Sugere-se que como resultado da absorção de sacarose, o ponto de congelamento é abaixado e a

quantidade de água livre congelável nos tecidos decresce e com isto a formação de cristais de gelo durante a exposição a temperaturas subzero é reduzida, melhorando a sobrevivência após o descongelamento (Panis *et al.*, 1996). O pré-tratamento com açúcares como a sacarose, estabilizam as membranas e proteínas durante situações de estresse como a desidratação e a exposição a temperaturas ultrabaixas (Crowe *et al.*, 1990), o que pode explicar a melhor regeneração de tecidos pré-tratados após o congelamento. De acordo com relatos recentes, os carboidratos conferem proteção porque eles substituem a água em biomoléculas desidratadas, satisfazendo os requerimentos de pontes de hidrogênio dos grupos polares das membranas, mantendo assim sua estrutura e função (Crowe *et al.*, 1990). Entretanto, a despeito dessas evidências, o papel exato dos açúcares na aquisição da tolerância à desidratação e congelamento ainda não foi estabelecido.

Efeito do pré-cultivo com sacarose

Nem a concentração de sacarose no meio de pré-cultivo, nem a duração do pré-cultivo, influenciaram a regeneração dos eixos embrionários após a desidratação para vários conteúdos de água (Figuras 3 e 4).

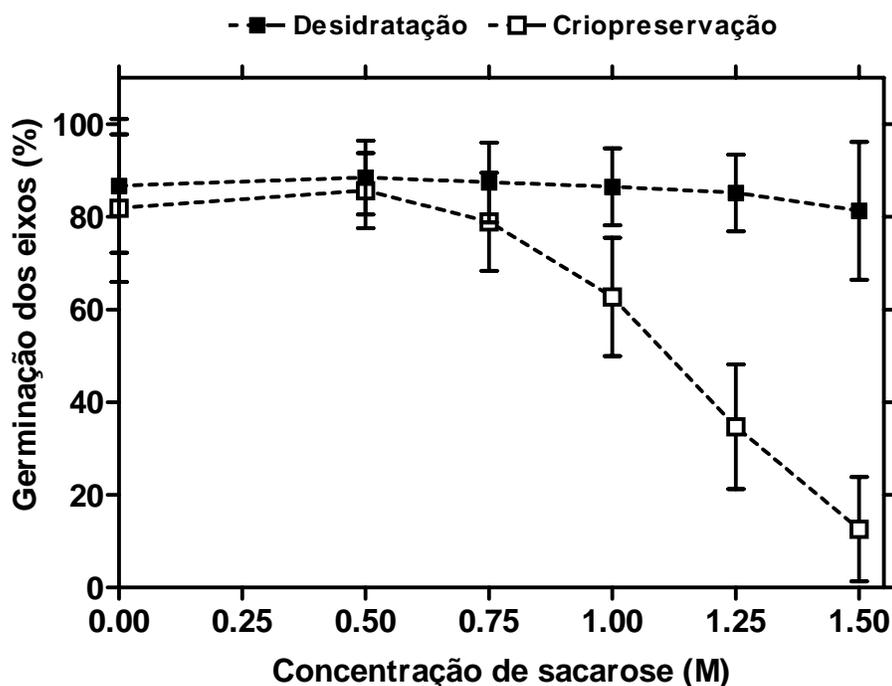


Figura 3: Efeito de concentrações crescentes de sacarose no meio de pré-tratamento sobre a tolerância de eixos embrionários de *C. sinensis* à desidratação (■) ou desidratação seguida de criopreservação (□). Os eixos foram encapsulados em gel de alginato de sódio antes do pré-tratamento com sacarose (de 0 a 1.5M, com aumento de 0.25M de cada vez, com 24h de cultivo em cada concentração) e desidratação sobre sílica gel para 0.25 gH₂O.g⁻¹ de peso seco. Cada ponto representa a média de três repetições ± SEM (P<0.05).

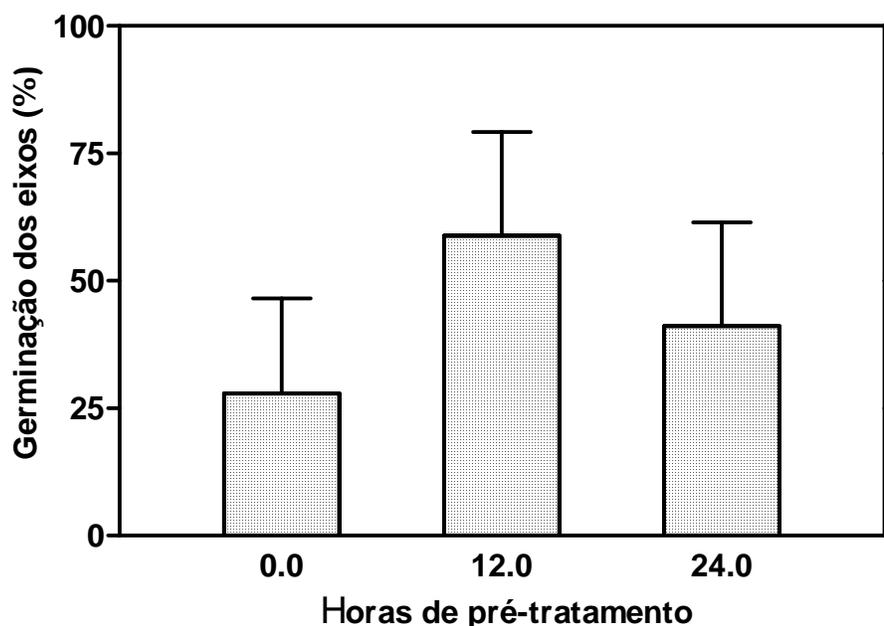


Figura 4: Efeito da duração do pré-cultivo com sacarose sobre a germinação dos eixos embrionários. Eixos embrionários de *C. sinensis* foram encapsulados em gel de alginato de sódio e pré-cultivados com 0.5M de sacarose e desidratados para $0.25 \text{ gH}_2\text{O.g}^{-1}$ de peso seco. Cada ponto representa a media de três repetições \pm SEM ($P>0.05$).

Entretanto, um efeito inibitório da sacarose a concentrações acima de 0.75 M foi observado quando eixos foram expostos ao nitrogênio líquido após a desidratação para $0.25 \text{ g H}_2\text{O.g}^{-1}$ de peso seco (Figura 3). Um efeito similar da sacarose foi observado quando ápices caulinares de batata e meristemas de banana encapsulados foram pré-cultivados com sacarose (Fabre & Dereuddre, 1990; Panis *et al.*, 1996). A sobrevivência de ápices de batata pré-tratados com sacarose em concentrações de 1 M ou mais diminuiu significativamente antes e após o congelamento em nitrogênio líquido (Fabre & Dereuddre, 1990). Panis *et al.* (1996) relataram que a adição de mais do que 0.3 M de sacarose ao meio retardou o crescimento e a proliferação de meristemas de banana e causou oxidação intensa dos tecidos. Esses autores concluíram que a sacarose em concentrações mais elevadas induziu um choque osmótico, o que causou a oxidação e reduziu o crescimento. Estes resultados indicam que embora os açúcares possam ter um papel muito importante na aquisição da resistência à desidratação e ao congelamento em nitrogênio líquido, e embora não sejam compostos tóxicos por natureza, diferentes tecidos de espécies de plantas

distintas podem apresentar limites diferentes de tolerância à presença de sacarose dentro de suas células. Assim, para aumentar a resistência à desidratação e ao congelamento em nitrogênio líquido sem afetar a integridade dos tecidos, a concentração de açúcar no meio de pré-cultivo deve ser determinada cuidadosamente para cada espécie de interesse.

O protocolo de criopreservação desenvolvido para eixos embrionários de *C. sinensis* foi testado com eixos de *C. limon* e *C. reticulata*. Eixos embrionários dessas duas espécies foram isolados, encapsulados, pré-tratados com sacarose, desidratados sobre sílica gel para vários conteúdos de água da mesma forma descrita para eixos embrionários de *C. sinensis* e então mergulhados em nitrogênio líquido. A porcentagem de regeneração para essas duas espécies e também para *C. sinensis* encontra-se na Figura 5.

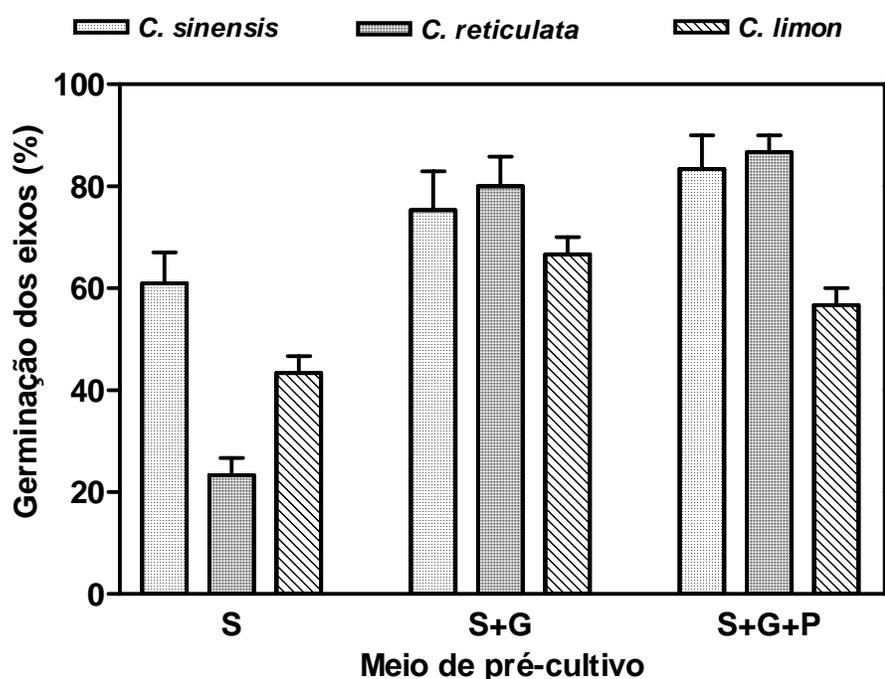


Figura 5: Germinação de eixos embrionários de três espécies de *Citrus* após a criopreservação. Os eixos foram encapsulados em gel de alginato de sódio, pré-tratados com sacarose (S; 0.5 e 0.75 M, aumento gradual, 24h de cultivo em cada concentração) ou em combinação com glicerol (S+G; 0.5M) e prolina (S+G+P; 0.045 M) e desidratados para um conteúdo de água de aproximadamente $0.25 \text{ gH}_2\text{Og}^{-1}$ de peso seco. Cada ponto representa a média de três repetições \pm SEM ($P < 0.0001$).

Efeito do pré-tratamento com glicerol e prolina

Em uma tentativa de melhorar a regeneração os eixos embrionários das três espécies glicerol e prolina foram adicionados ao meio de pré-cultivo. O glicerol é um crioprotetor permeável à membrana plasmática e o aminoácido prolina pode ser um crioprotetor eficiente das células vegetais, tendo sido usada com bons resultados para a de criopreservação células de *Zea mays* L. (Withers & King, 1979).

A regeneração de plântulas a partir de eixos embrionários das três espécies após o pré-cultivo em meio contendo sacarose sozinha ou combinada com glicerol e prolina está apresentada na Figura 5. Eixos embrionários de *C. sinensis* tratados com sacarose apenas apresentaram 61.0% de germinação, mas para eixos pré-cultivados com a combinação de 0.5 M de glicerol com 0.8 M de sacarose a germinação aumentou para 83.0% (Figura 5). O mesmo pré-tratamento causou um aumento de três vezes (de 23 para mais de 87.0%) na regeneração de eixos embrionários de *C. reticulata* criopreservados em nitrogênio líquido. Houve um aumento similar, mas muito menos pronunciado, no caso de eixos de *C. limon* (Figura 5).

A adição de 0.045 M de prolina ao meio de pré-cultivo suplementado com 0.5M de glicerol mais 0.8M de sacarose promoveu um pequeno aumento na regeneração de plântulas a partir de eixos de *C. sinensis* e *C. reticulata*, comparado com o pré-tratamento apenas com sacarose ou com sacarose mais glicerol. Entretanto, no caso de *C. limon* a presença desse aminoácido no meio de pré-cultivo causou um pequeno decréscimo na germinação dos eixos (Figura 5). Demonstrou-se que a prolina se acumula em plantas halófitas expostas ao estresse de salinidade, e em uma grande variedade de plantas expostas aos estresses de frio e hídrico (Liu & Zhu, 1997; Xin & Li, 1993). Ela é um aminoácido altamente solúvel, neutro, que exerce uma alta pressão osmótica, e não é tóxico em altas concentrações (Liu & Zhu, 1997). Os mecanismos pelos quais a prolina induz a tolerância ao estresse não são claros. Tem sido sugerido que a prolina evita danos às membranas celulares por prevenir a peroxidação de lipídios por agir como um antioxidante, e dessa forma ela neutraliza o efeito nocivo de radicais livres induzidos por estresse que se acumulam nas células (Xin & Li, 1993). Thomas & James (1993) relataram que embora os níveis de prolina tenham aumentado em plantas de *Lolium perenne* L. durante tratamentos de estresse hídrico e de frio, seu

acúmulo não melhorou a tolerância a tais estresses nessa espécie. Eles sugerem que o acúmulo de prolina e outros aminoácidos é uma consequência da redução na síntese de proteínas ou do aumento da degradação de proteínas durante o período de estresse, em vez de uma evidência de aumento na tolerância ao estresse. Uma interação significativa (Figura 5) ocorreu quando a sacarose mais o glicerol ou sacarose mais glicerol mais prolina foi testada com as três espécies em comparação com apenas sacarose. A sobrevivência de eixos de *C. reticulata* e *C. limon* melhorou quando glicerol sozinho e glicerol mais prolina foram adicionados à sacarose.

Em conclusão, a desidratação antes do congelamento em nitrogênio líquido é fundamental para permitir a regeneração no método de criopreservação descrito neste trabalho. Eixos totalmente hidratados não sobreviveram o congelamento em nitrogênio líquido e a melhor regeneração foi obtida por eixos com teor de umidade na faixa de 0.15 a 0.17 g H₂O.g⁻¹ de peso seco. Eixos embrionários suficientemente desidratados que foram armazenados a -196°C mantiveram sua viabilidade e vigor, germinando normalmente após a transferência para o meio de regeneração. O encapsulamento em gel de alginato de sódio e a adição de sacarose ao meio de pré-cultivo não reduziram a viabilidade dos eixos. Entretanto, eixos com conteúdos de água abaixo ou acima da faixa ótima se beneficiaram do pré-tratamento com sacarose, mostrando melhoria na regeneração após o congelamento a -196°C. A adição de 0.5 M de glicerol a 0.8 M de sacarose melhorou significativamente a sobrevivência de eixos de *C. reticulata* e *C. limon*, mas não de *C. sinensis*. Este procedimento de criopreservação oferece muitas vantagens, principalmente, facilidade de manuseio dos explantes, simplicidade do meio crioprotetor, eliminação do uso de congeladores programáveis caros, sobrevivência independente da taxa de congelamento e aumento do tamanho de explantes que podem sobreviver exposição ao nitrogênio líquido. Ele é também um procedimento simples e sem efeitos tóxicos que pode ser usado de forma rotineira para as três espécies de *Citrus* testadas, uma vez que as condições de requeridas para a tolerância à desidratação sejam atingidas. Avaliação da viabilidade após o armazenamento em longo prazo precisam ser conduzidos para determinar se ocorre deterioração durante o armazenamento.

Referências

- ARAKAWA, T.; CARPENTER, J. F.; KITA, Y. A.; CROWE, J. H. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis. **Cryobiology**, v. 27, p. 401-415, 1990.
- BERJAK, P. M.; WALKER, D. J.; MYCOCK, J.; WESLEY-SMITH, P. W.; PAMMENTER, N. W.. Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos. pp In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed). **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Rome: IBPGR; Tsukuba: JIRCAS, 2000. p.140-155.
- 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.
- DRAGET, K. I.; MYHRE, S.; SKJÅKBR'K, G.; ØSTGAARD, K. Regeneration, cultivation and differentiation of plant protoplasts immobilized in Ca-alginate beads. **Journal of Plant Physiology**, v. 132, p. 552-556, 1988.
- DUMET, D.; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y.; DEREUDDRE, 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.
- DURAN-VILA, N. Cryoconservation of germplasm of *Citrus*. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed). **Biotechnology in Agriculture and Forestry, cryopreservation of Plant Germplasm 1**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1995. v. 32, p. 70-86.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, v. 41, 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.
- FABRE, J.; DEREUDDRE, J. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. **Cryo-Letters**, v. 11, p. 413-426, 1990.
- FOURRÉ, J. L.; BERGER, P.; NIQUET, L.; ANDRÉ, P. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, p. 159-169, 1997.
- HONG, T. D.; ELLIS, R. H. Interspecific variation in seed storage behaviour within two genera – *Coffea* and *Citrus*. **Seed Science and Technology**, v. 23, p. 165-181, 1995.
- KARP, A. On the current understanding of somaclonal variation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 7, p. 1-58, 1991.

KOBAYASHI, S.; SAKAI, A.; OIYAMA, I. Cryopreservation in liquid nitrogen of cultured navel orange (*Citrus sinensis* [L.] Osb.) nucellar cells and subsequent plant regeneration. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.23, p. 15-20, 1990.

LIU, J.; ZHU, J. K. Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 114, p. 591-596, 1997.

MARIN, M. L.; DURAN-VILA, N. Survival of somatic embryos and recovery of plants of sweet orange (*Citrus sinensis* [L.] Osb.) after immersion in liquid nitrogen. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 14, p. 51-57, 1988.

MARIN, M. L.; GOGORCENA, Y.; ORTIZ, J.; DURAN-VILA, N. Recovery of whole plants of sweet orange from somatic embryos subjected to freezing/thawing treatments. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 34, p. 27-33, 1993.

MATHUR, J.; AHUJA, P. S.; LAL, N.; MATHUR, A. K. Propagation of *Valeriana wallichii* DC. Using encapsulated apical and axial shoot buds. **Plant Science**, v. 60, p. 111-116, 1989.

MUMFORD, P. M.; GROUT, B. W. W. Desiccation and low temperature (- 196°C) tolerance of *Citrus limon* seed. **Seed Science and Technology**, v. 7, p. 407-410, 1979.

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

PANIS, B.; TOTTE, N.; NIMMEN, K. van; WITHERS, L. A.; SWENNEN, R. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem cultures after pre-culture on sucrose. **Plant Science**, v. 121, p. 95-106, 1996.

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.

PENCE, V. C. Cryostorage of embryo axes of several large-seeded temperate tree species. **Cryobiology**, v. 27, p. 212-218, 1990.

RADHAMANI, J.; CHANDEL, K. P. S. Cryopreservation of embryonic axes of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf.). **Plant Cell Reports**, v. 11, p. 204-206, 1992.

Roberts, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v. 1, p. 499-514, 1973.

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.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) by a simple freezing method. **Plant Science**, v. 74, p. 243-248, 1991.

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).

SUZUKI, T.; KANEKO, M.; HARADA, T. Increase in freezing resistance of excised shoot tips of *Asparagus officinalis* L. by pre-culture on sugar-rich media. **Cryobiology**, v. 34, p. 264-275, 1997.

THOMAS, H.; JAMES, A. R. Freezing tolerance and solute changes in contrasting genotypes of *Lolium perenne* L. acclimated to cold and drought. **Annals of Botany**, v. 72, p. 249-254, 1993.

WITHERS, L. A.; KING, P. J. Proline: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of cultured cells of *Zea mays* L. **Plant Physiology**, v. 64, p. 675-678, 1979.

XIN, Z.; LI, P. H. Relationship between proline and abscisic acid in the induction of chilling tolerance in maize suspension-cultured cells. **Plant Physiology**, v. 103, p. 607-613, 1993.