

**Crioconservação no
Melhoramento Vegetal**



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

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

Diretoria Executiva da Embrapa

Clayton Campanhola
Diretor-Presidente

Gustavo Kauark Chianca
Herbert Cavalcante de Lima
Mariza Marilena Tanajura Luz Barbosa
Diretores Executivos

Embrapa Algodão

Robério Ferreira dos Santos
Chefe Geral

Luiz Paulo de Carvalho
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Auxiliadora Lemos Barros
Chefe Adjunto de Administração

Ramiro Manoel Pinto Gomes Pereira
Chefe Adjunto de Comunicação, Negócio e Apoio



ISSN 0103-0205
Setembro, 2003

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Algodão

Documentos 115

Crioconservação no Melhoramento Vegetal

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Márcia Soares Vidal

Campina Grande, PB
2003

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Algodão

Rua Osvaldo Cruz, 1143 – Centenário
Caixa Postal 174
CEP 58107-720 - Campina Grande, PB
Telefone: (83) 315-4300
Fax: (83) 315-4367
algodao@cnpa.embrapa.br
<http://www.cnpa.embrapa.br>

Comitê de Publicações

Presidente: Luiz Paulo de Carvalho
Secretária: Nívia Marta Soares Gomes
Membros: Demóstenes Marcos Pedrosa de Azevedo
José Wellington dos Santos
Lúcia Helena Avelino Araújo
Márcia Barreto de Medeiros Nóbrega
Maria Auxiliadora Lemos Barros
Maria José da Silva e Luz
Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão
Rosa Maria Mendes Freire
Supervisor Editorial: Nívia Marta Soares Gomes
Revisão de Texto: Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Tratamento das ilustrações: Geraldo Fernandes de Sousa Filho
Fotos da capa: Raimundo Estrela Sobrinho
Editoração Eletrônica: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

1ª Edição

1ª impressão (2003): 1.000 exemplares

Todos os direitos reservados

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

EMBRAPA ALGODÃO (Campina Grande, PB).

Crioconservação no Melhoramento por Julita Maria Frota Chagas Carvalho e Márcia Soares Vidal . Campina Grande, 2003.

22p. (Embrapa Algodão. Documentos, 115).

1. Biotecnologia. I. Carvalho, J.M.F.C. II. Vidal, M.S. III. Título. IV. Série.

CDD 660.6

© Embrapa 2003

Autores

Julita Maria Frota Chagas Carvalho

Dra. Engº Agrº da Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143
Centenário C.P.174
CEP 58107-720 Campina Grande, PB. Tel.: OXX83 315 4300
e-mail: julita@cnpa.embrapa.br

Márcia Soares Vidal

Dra., Bióloga da Embrapa Algodão
e-mail: mvidal@cnpa.embrapa.br

Apresentação

O desenvolvimento de técnicas para a conservação de germoplasma por um longo prazo com a máxima integridade genética e biológica possível, tem sido uma preocupação constante dos melhoristas. Com este trabalho, a Embrapa Algodão coloca a disposição das pessoas ligadas a agricultura, informações sobre as técnicas de preservação de germoplasmas vegetal.

Robério Ferreira dos Santos
Chefe Geral da Embrapa Algodão

Sumário

Crioconservação no Melhoramento Vegetal.....	11
1. Introdução	11
2. Panorama do cultivo de tecidos na cConservação de germoplasma vegetal.....	12
2.1. Conservação, preservação e intercâmbio de germoplasma..	13
2.1.1. Preservação In vitro.....	14
3. Referências bibliográficas	22

Crioconservação no Melhoramento Vegetal

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Marcia Soares Vidal

1. 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 e SEUFFERHELD, 1995). Este fenômeno vem causando enormes perdas na diversidade genética de espécies de plantas nativas chegando muitas vezes à sua completa extinção. Outro fator que favorece o desequilíbrio na manutenção de variabilidade genética é o emprego maciço na agricultura de espécies selecionadas, devido ao seu potencial nutricional, alta produtividade ou por resistência a doenças e estresses ambientais (VILLALOBOS et al., 1991).

A execução de programas de melhoramento genético para a criação de novas cultivares que atendam às demandas agroindustriais está intimamente relacionada à manutenção dos acessos armazenados nos diferentes Bancos de Germoplasma mantidos em diversas instituições. Atualmente, a manutenção de germoplasmas é realizada mais freqüentemente por meio do banco de sementes e coleções de campo. No entanto, estas formas de manutenção estão longe de satisfazer as necessidades atuais e futuras, devido ao custo de manutenção, além do elevado risco de contaminação e perda de viabilidade por muitos anos, no caso dos bancos de sementes e também pela ação de pragas, doenças ou condições adversas ao ambiente a que as coleções de campo são expostas.

As técnicas de cultivo *in vitro*, empregando-se o crescimento lento, vêm sendo vistas como alternativa para os bancos de sementes, pois visam à conservação de germoplasma vegetal; no entanto, tais metodologias asseguram a manutenção por um período curto de tempo (seis a doze meses) dependendo do procedimento ou da espécie de planta. Portanto, o emprego de um sistema de manutenção a médio e longo prazo para conservação de estruturas organizadas com alta estabilidade genética e biológica e espécies com sementes recalcitrantes ou intermediárias, é de fundamental importância para armazenamento dos acessos num Banco de Germoplasma. Atualmente, a crioconservação é a única técnica capaz de atender a esses pré-requisitos. Nos últimos anos, numerosos relatos de criopreservação de plantas de propagação vegetativa, cereais e gramíneas, plantas ornamentais, frutíferas tropicais e temperadas, leguminosas e oleaginosas, estimulantes e medicinais foram publicados, expondo-se diversas estratégias, desde o tipo de explante até o emprego de diferentes tipos de crioconservante.

2. Panorama do Cultivo de Tecidos na Conservação de Germoplasma Vegetal

Segundo IBPGR (1991), germoplasma é o material que constitui a base física da herança e se transmite de uma geração para outra através de células reprodutivas. Numa visão mais ampla, germoplasma pode ser considerado a soma total dos materiais hereditários de uma espécie (ALLARD, 1960). Outros, ainda, definem germoplasma como sendo um indivíduo ou clone que representa uma espécie ou cultura passível de ser mantido em reservatório.

Acesso é o termo utilizado para qualificar toda amostra de germoplasma que representa a variação genética de uma população ou de um indivíduo propagado clonalmente.

Diversos procedimentos relacionados à biotecnologia têm sido adotados com variado grau de sucesso no melhoramento de diversas espécies de interesse econômico: 1) a micropropagação; 2) a regeneração de híbridos somáticos, tanto intergenéricos como interespecíficos, pela fusão de protoplastos; 3) a obtenção de haplóides; 4) a seleção *in vitro* de variantes somaclonais; e 5) transformação. Além disso, as técnicas de propagação vegetativa *in vitro* se adequam a programa de introdução, armazenamento e intercâmbio de germoplasma, contribuindo para prevenir perda de variabilidade genética. No entanto, o uso da biotecnologia no melhoramento genético das plantas depende de protocolos de regeneração *in vitro* a partir da cultura de células e/ou de tecidos, incluindo a embriogênese somática e surperbrotamento.

2.1. Conservação, preservação e intercâmbio de germoplasma

Embora os termos conservação e preservação sejam muito utilizados, vale ressaltar a diferença existente entre eles. Frankel e Soule (1981) propuseram que conservação é um conjunto de políticas e programas criados para a manutenção em longo prazo de comunidades sob condições potenciais para contínua evolução, já preservação é a manutenção de indivíduos ou grupos sem efeito da evolução.

A variação genética pode ser mantida sob diferentes sistemas e metodologias. Todavia, entre as metodologias com maior destaque para recursos genéticos estão as reservas genéticas para conservação da diversidade genética *in situ* e as coleções de germoplasma para conservação de variabilidade genética *ex situ*, em que podem ser mantidos indivíduos, sementes, embriões ou outras estruturas vegetais sob diferentes condições, dependendo do material utilizado: no campo ou em casas- de- vegetação, em câmaras secas sob baixa temperatura, em meio de cultura com baixas concentrações salinas (conservação *in vitro*) ou criopreservadas.

A conservação da variação genética dos acessos mantidos fora do seu ambiente natural, em coleções de germoplasma *ex situ*, representa um permanente desafio para evitar alterações genéticas na amostra populacional submetida à paralisação ou “congelamento” do processo evolutivo que atuava sobre a população no momento da amostragem. Por outro lado, quando a conservação dos acessos é realizada em seu ambiente natural, o processo evolutivo continua e com ele novas formas de variação genética podem ocorrer e serem amostradas (FRANKEL e SOULE, 1981).

Segundo Pasqual et al. (1997), Banco de Germoplasma destina-se à preservação da máxima variabilidade genética vegetal existente, desde as novas cultivares até as espécies silvestres, tendo como objetivo:

- conservar fontes genéticas para futuro uso em melhoramento e estudos genéticos;
- manter coleções de diferentes genótipos devidamente caracterizados e avaliados para uso em programas de melhoramento e,
- prevenir e evitar a perda de recursos genéticos.

Alguns critérios devem ser considerados na escolha das culturas e materiais a

serem conservados: 1) importância econômica e social; 2) ameaça de perda da variabilidade genética; 3) necessidade para uso em melhoramento genético e 4) viabilidade de conservar o germoplasma coletado.

2.1.1. Preservação *in vitro*

A preservação de material genético *in vitro* é uma técnica promissora de manutenção de genes, que poderá estar disponível facilmente. Mantendo-se plantas ou segmentos das mesmas de diferentes procedências e genótipos em condições de crescimento mínimo ou mesmo em criopreservação, pode-se dispor desses materiais para uso no melhoramento genético, podendo-se utilizá-lo para intercâmbio entre instituições dentro do País ou com o exterior sem os riscos de estar levando pragas ou doenças a novas regiões; outra vantagem é a necessidade de pequeno espaço para preservação de grande quantidade de genótipos.

A conservação do germoplasma através da preservação *in vitro* (Figura 1), é especialmente útil para espécies com sementes recalcitrantes, como a maioria das espécies perenes tropicais, que perdem a sua viabilidade em curto período de tempo nos sistemas convencionais de conservação. Além disto, esta forma de preservação é importante para espécies de propagação vegetativa que, produzindo ou não sementes, apresentam alta segregação genética devido ao elevado grau de heterozigose, implicam na necessidade de manter-se as plantas

Foto: Sérgio Cabel.



Fig. 1. Preservação de cultivar de algodão *in vitro*.

em Bancos Ativos de Germoplasma (BAG) é aumentando o custo da preservação dos acessos. A preservação *in vitro* apresenta algumas desvantagens, tais como: necessidade de subcultivos periódicos, risco de perda por contaminação, risco de danos dos equipamentos de controle ambiental, possibilidade de variação genética ao longo do cultivo e inviabilidade do material estar prontamente disponível para uso do melhorista.

É grande o número de espécies vegetais cuja conservação é acessível às técnicas *in vitro* (Tabela 1); no entanto, deve-se fazer uma avaliação cuidadosa das

Tabela 1. Gêneros que podem ser cultivados *in vitro*.

Cultivos	Gêneros	
Propagados vegetativamente	<i>Solanum</i>	<i>Olea</i>
	<i>Manihot</i>	<i>Ananas</i>
	<i>Musa</i>	<i>Ficus</i>
	<i>Ipomoea</i>	<i>Agave</i>
	<i>Xanthosoma</i>	<i>Vanilla</i>
	<i>Colocasia</i>	<i>Allium</i>
	<i>Dioscorea</i>	<i>Piper</i>
	<i>Canna</i>	<i>Saccharum</i>
	<i>Vitis</i>	<i>Tuberculo andinos (varios gêneros)</i>
Propagados sexualmente	<i>Citrus</i>	<i>Anacardium</i>
	<i>Elaeis</i>	<i>Theobroma</i>
	<i>Coccus</i>	<i>Hevea</i>
	<i>Malus</i>	<i>Chinchona</i>
	<i>Persea</i>	<i>Cinnamonium</i>
	<i>Mangifera</i>	<i>Coffea</i>
	<i>Macadamia</i>	<i>Camellia</i>
	<i>Durio</i>	<i>Artocarpus</i>

Fonte: Roca et al. (1991).

vantagens e desvantagens da conservação *in vitro* para cada caso específico (ROCA et al., 1991).

O material vegetativo utilizado nesse tipo de cultivo é o explante, que pode ser retirado de diferentes estruturas da planta. Deve-se preferir material geneticamente estável, como o meristema. Calos, anteras, células em suspensão e protoplastos, são materiais considerados instáveis e, por isso, não são empregados na preservação.

Há duas formas de preservação *in vitro*, uma mediante a limitação do crescimento até a taxa mínima e a outra conforme a supressão total do crescimento e do metabolismo celular (criopreservação).

Dependendo das características específicas de cada germoplasma vegetal, pode ser utilizada uma ou mais formas de conservação. De maneira bem geral e para melhor situar a preservação de germoplasma *in vitro* são apresentadas as várias formas pelas quais ela pode ser feita.

A) Crescimento Mínimo ou Crescimento Zero

A cultura de tecidos *in vitro*, também conhecida como coleção ativa, é mais uma

opção para a conservação de espécies com sementes recalcitrantes com elevada heterozigose e de propagação vegetativa.

O crescimento rápido dos cultivos exige mais mão-de-obra e aumenta a possibilidade de perdas devido a acidentes de contaminação microbiana durante a repicagem contínua dos subcultivos, sendo necessário, então, reduzir ao mínimo a frequência dos subcultivos e minimizar a possibilidade de variação genética.

Para manter as plantas com crescimento mínimo ou crescimento zero, algumas técnicas são utilizadas (PASQUAL, 1998):

- Alteração nas condições ambientais, especialmente em se reduzindo a temperatura na sala de crescimento para 0- 6°C (espécies de clima temperado) e para 15-20°C (espécies de clima tropical e subtropical. Pode ser utilizada também, a redução da pressão atmosférica e da disponibilidade de oxigênio acarretando a redução da taxa de crescimento.
- Modificação no meio básico de cultura, pela omissão ou redução de alguns fatores essenciais ao crescimento normal. Dobrando-se a concentração de sacarose no meio acima dos 3% do meio-padrão, pode-se aumentar a longevidade da planta *in vitro* submetida à redução do crescimento.
- Uso de retardadores de crescimento, como ácido abscísico ou compostos de efeito osmótico, como o manitol e sorbitol.
- Recobrimento de estruturas com uma camada de óleo mineral, reduzindo a taxa de crescimento e conseqüentemente a necessidade de subculturas freqüentes.

O armazenamento de germoplasma em crescimento lento é um método viável para manter grandes coleções em pouco espaço, livre das infestações de pragas e enfermidades. Entretanto, o crescimento lento é limitado em dois aspectos: primeiro, não é considerado muito seguro para sistemas de células não organizadas e calo. Embora tenham sido relatados alguns sucessos na conservação, a possibilidade de ocorrência de variação somaclonal nessas culturas deve ser considerada, apresentando um grande risco; em segundo lugar, as condições não são consideradas suficientemente estáveis para a conservação de germoplasma a longo prazo, mesmo para culturas de explantes de parte aéreas (IBPGR, 1983). Necessita-se de uma tecnologia que seja análoga ao armazenamento de sementes ortodoxas secas a baixa temperatura; somente a criopreservação (conservação por congelamento à temperatura de nitrogênio

líquido (-196°C) ou próximo a esta temperatura, oferece esta possibilidade (WITHERS, 1998).

B) Criopreservação

A criopreservação de coleção base se refere a conservação de material biológico sob condições de ultra baixas temperaturas em nitrogênio líquido a -196°C, ou em sua fase de vapor, a (-150°C) (KARTHA, 1985). Este conceito define criopreservação.

A criopreservação é capaz de interromper todo o metabolismo celular e tem sido considerada a maneira mais promissora de preservação a longo prazo para células, tecidos e órgãos vegetais. A partir desses explantes, poderão ser regeneradas plantas em qualquer época, sem risco de variações genéticas no material preservado. A criopreservação, como todos os métodos, possui suas vantagens e desvantagens (Tabela 2).

A criopreservação pode ser utilizada para todos os tipos de explante, tais como: meristemas, suspensões celulares, embriões (somáticos, zigóticos ou nucelares) e protoplastos. De modo geral, estruturas de tamanho reduzido são mais apropriadas para o congelamento, uma vez que a desidratação e o congelamento ocorrem de forma mais rápida e uniforme em estruturas menores.

Conforme Santos (2000), nos últimos vinte anos foram publicados na literatura numerosos relatos de criopreservação de plantas de propagação vegetativa, cereais e gramíneas, plantas ornamentais, frutíferas tropicais e temperadas,

Tabela 2. Principais vantagens e desvantagens da criopreservação.

Vantagens	Desvantagens
• Conservação por tempo indeterminado sem perda da viabilidade • Preservação de estruturas (células tecidos e órgão) • Evita variação somaclonal • Em banco de germoplasma, é um processo econômico	• Complexidade técnica e biológica dos processos de congelamento e descongelamento • Cada cultura exige procedimento específico, exigindo o desenvolvimento de um protocolo para cada caso

Fonte: Pasqual (1998).

leguminosas e oleaginosas, estimulantes medicinais e aromáticas, entre outras, (Tabela 3). Material jovem, em estágio meristemático, é mais apropriado porque suas células são pequenas e contêm citoplasma denso com poucos vacúolos e, portanto pouca água (Engelmann, 1991). Entretanto, outros tipos de material vegetal como pontas de ápice, raízes, células em cultura, protoplastos, pólen,

Tabela 3. Lista de algumas espécies de plantas de importância econômica criopreservadas com sucesso.

Grupo/Espécie	Explante/Técnica	Sobrevivência (%)
a) Raízes, bulbos e tubérculos		
Alho (<i>Allium sativum</i> L.)	M/V	90
Batata inglesa (<i>solanum</i> spp.)	A/E-D	10
Batata-doce (<i>Ipomea batatas</i> L.)	A/V	23
Mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	EZ/CL-R	97
b) Cereais e gramíneas		
Trigo (<i>Triticum</i> spp.)	EZ/CL	70
Milho (<i>Zea mays</i> L.)	EZ/CL	80
Cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinale</i> L.)	A/E-D	38-91
c) Plantas ornamentais		
Cravo (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.)	G/CL	90
Crisântemo (<i>Chrysanthemum</i> spp.)	A/CL	90
d) Frutíferas tropicais e temperadas		
Banana (<i>Musa</i> spp.)	SC/CL	42
Citrus (<i>Citrus sinensis</i> [L.] Osb.)	ES/CL	5
Maçã (<i>Malus</i> spp.)	G/CL	-
Morango (<i>Fragaria</i> spp.)	SC/V	87
Pêra (<i>Pyrus communis</i> L.)	A/E-D	47
Videira (<i>Vitis vinifera</i> L.)	A/E-D	30
e) Leguminosas e oleaginosas		
Amendoim (<i>Arachis hypogea</i> L.)	EZ/CL	90
Côco (<i>Cocos nucifera</i> L.)	EZ/D	70
Grão-de-bico (<i>Cicer</i> spp.)	A/V	60
Oliveira (<i>Olea europea</i> L.)	EZ/D	70
f) Estimulantes, medicinais e aromáticas		
Café (<i>Coffea arabica</i> L.)	EZ/D	95
Chá (<i>Camellia sinensis</i> [L.] O. Kuntze	EZ/D	95

Tipo de material: A – ápice caulinar; ES – embrião somático; EZ – embrião zigótico; G – gema lateral; M – meristema; SC – suspensão celular; Técnica de congelamento: CL – congelamento lento; CL-R – congelamento lento e rápido; D – desidratação; E-D encapsulamento-desidratação; V – vitrificação.
Fonte: Santos (2000).

anteras, embriões somáticos e zigóticos e sementes inteiras de várias espécies, tem sido regenerados com sucesso após congelamento em nitrogênio líquido por períodos de tempo que variam de algumas horas até alguns anos. (KARTHA, 1985; WITHERS, 1987; GOES, 1993).

A criopreservação de estruturas vegetais envolve uma sequência de tratamentos destinados a minimizar os danos causados pela baixa temperatura e pelo restabelecimento do vegetal em meio de cultura.

Os métodos de criopreservação podem ser desdobrados em etapas conhecidas como: pré-crescimento, crioproteção, resfriamento, armazenamento, descongelamento e regeneração (WITHERS, 1984, 1985a, 1985b; KARTHA, 1985).

- **Pré-crescimento** – consiste em uma fase preparatória, onde se fornece à cultura condições para tolerância ao congelamento. Envolve suplementação de compostos osmoticamente ativos ao meio, além de outras substâncias;
- **Crioproteção** – consiste na aplicação de um ou mais compostos que permitam à célula tolerar as mudanças físicas e químicas relacionadas ao congelamento e descongelamento;
- **Resfriamento** – o resfriamento pode ser feito lento ou rápido. As duas formas proporcionam diferentes mecanismos de sobrevivência. No esfriamento lento, o gelo é formado fora da célula, evitando a cristalização de gelo na célula. Como a água é retirada para o meio extracelular, a célula fica desidratada e essa desidratação reduz a quantidade de água disponível à formação prejudicial de cristais de gelo. Em seguida, o conteúdo de água se solidifica ocorrendo normalmente a formação de cristais de gelo inofensivos à integridade da célula. O esfriamento rápido induz a um congelamento intracelular, evitando a desidratação da célula. Este tipo de esfriamento minimiza a formação de gelo prejudicial pela formação de pequenos cristais de gelo devido aos agentes crioprotetores. Geralmente, o esfriamento rápido é bem mais difícil de se conseguir que o esfriamento lento;
- **Armazenamento** – é feito em botijões ou tanques criogênicos contendo nitrogênio, mantendo as espécies a (-196 °C) na fase líquida, ou (- 150 °C) na fase de vapor;
- **Descongelamento** – esta etapa é tão importante quanto a fase de esfriamento. Deve ser feito rapidamente para assegurar que nenhum gelo na célula se

descongele com possibilidade de se recrystalizar em grandes cristais prejudiciais;

- **Regeneração** – reestabelecer o crescimento após a criopreservação é uma das fases críticas deste método. Deve-se permitir a retomada dos processos metabólicos interrompidos pelo congelamento com o mínimo distúrbio osmótico e físico.

Torna-se necessário desenvolver procedimentos específicos para cada tipo de cultura, pois diferentes sistemas de cultura reagem diferentemente à criopreservação, mas a criopreservação é mais adequada que o crescimento lento para o grande elenco de sistema de cultura.

Uma vez que pouquíssimos materiais biológicos suportam temperaturas abaixo de zero em seu estado natural, alguns protocolos de criopreservação envolvem uma etapa de tratamento com crioprotetores, que são produtos químicos capazes de baixar a temperatura na qual o congelamento ocorre, reduzindo assim a água intracelular e alterando o tamanho dos cristais de gelo formados o que minimiza os danos (WITHERS, 1998). Alta solubilidade e baixa toxidez são características essenciais para o sucesso de um crioprotetor. O glicerol foi o primeiro composto químico empregado na crioproteção, seguido pelo dimetil sulfoxido (DMSO). Embora hoje exista uma série de crioprotetores, estes dois compostos ainda são os mais usados (MORRIS, 1980; KARTHA, 1987).

Existem dois métodos de criopreservação: um baseado no congelamento lento e outro no congelamento rápido.

O método de congelamento lento (Figura 2) é comumente utilizado para a criopreservação de células em suspensão, com base no princípio de evitar danos causados pelo gelo por meio da desidratação por resfriamento lento.

O método de congelamento rápido está baseado na vitrificação (Figura 3) e no encapsulamento-desidratação, permitindo a sobrevivência de materiais extremamente sensíveis à desidratação e congelamento, evitando danos causados pela formação de cristais microscopicamente pequenos nos tecidos e simplificando, o processo de criopreservação (SANTOS, 2000). Esta técnica tem sido utilizada com relativo sucesso, especialmente em ápices caulinares, mas é muito menos flexível e, por isso, envolve maiores riscos que o resfriamento lento.

Apesar da criopreservação ter sido testada preliminarmente em diversas

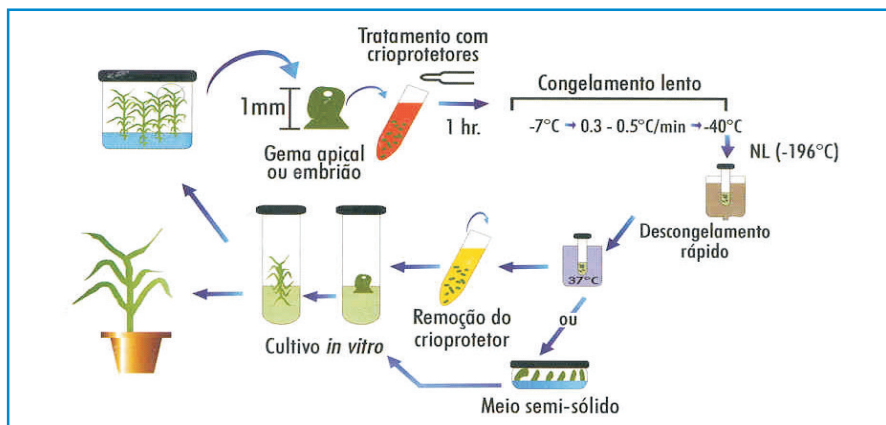


Fig. 2. Diagrama mostrando as diferentes etapas do congelamento lento (método clássico).

Fonte: Santos (2001).

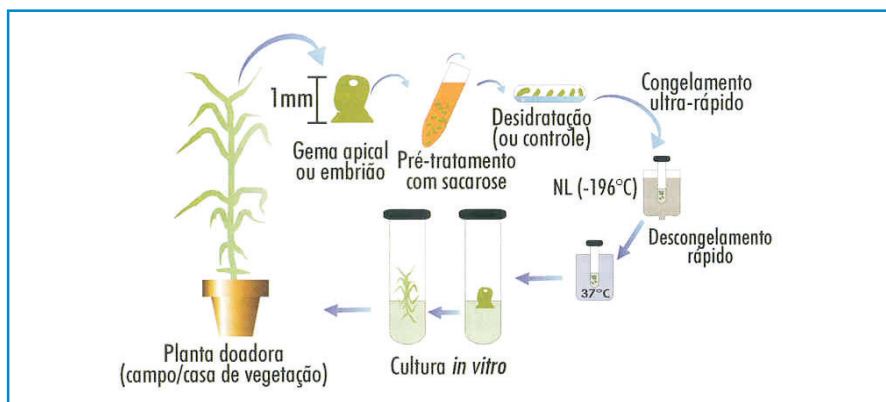


Fig. 3. Diagrama mostrando as diferentes fases do congelamento rápido (método contemporâneo).

Fonte: Santos (2001).

espécies, ainda não existe uma rotina de laboratório que possa garantir a conservação de germoplasma vegetal. Isto se deve à complexidade, tanto técnica como biológica, que envolve os processos de congelamento e descongelamento dos seres vivos. Além disso, diferentes espécies reagem de maneira diversa a crioconservação, de forma que se torna necessário o desenvolvimento de metodologias que atendam às exigências de cada espécie (WILLIAMS, 1990).

3. Referências Bibliográficas

- ALDWINCKLE, T.S.; AHKONG, Q.F.; BANGHAM, A.D.; FISCHER, D.; LUCY, J.A. Effects of polyethylene glycol liposome and erythrocytes: permeability changes and membrane fusion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.689, p. 548-560, 1982.
- ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant gerplasma review. **Euphytica**, v.57, p. 227-243, 1991.
- FRANKEL, O.H.; SOULE, M.E. Conservation and Evolution. Cambridge, Cambridge University Press, 1981.
- GOES, M. **Studies on the conservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam.) germplasm. 1993. Tese doutorado - Universidade de Bath, UK, 1993.**
- HORN, M.E.; CONGER, B.V.; HARMS, C.T. Plant regeneration from protoplasts of embryogenic suspension cultures of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) **Plant Cell Reports**, v.7, p. 371-374, 1988.
- IBPGR (Roma, Itália). **Advisory committee on in vitro Storage**: report of the First Meeting. Rome, 1983.
- IBPGR (Roma, Itália). **Elsevier's dictionary of plant genetic resources**. Roma: International Board for Plant Resources, 1991.
- KARTHA, K.K. Meristem culture and germplasm preservation. In: KARTHA, K.K. **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton: CRC Press, 1985. p.115-134, 1985.
- KARTHA, K.K. Advances in the cryopreservation technology of plant cells and organs. In: LISS, A.R. **Plant tissue and cell culture**. [s.l.: s.n.], 1987. p.447-458, 1987.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações. Lavras: Ed. Brasil, 1997.

PASQUAL, M.; CARVALHO, G.R.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Aplicações no melhoramento genético de plantas**. Lavras, Brasil, 1998.

MORRIS, G.J. Plant cells. In: MORRIS, G.J. **Plant cells and low temperature preservation in medicine and biology**. Kent: Pitman Medical, 1980. p.253-284.

ROCA, W.M.; ARIAS, D.I.; CHÁVES, R. Métodos de conservación in vitro del germoplasma. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. ed. **Cultivo de tejidos en la agricultura**. Cali, Colombia: [s.n.], 1991. p.696-713.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.70- 84, 2000.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Bio-Tecnologia: Ciência & Desenvolvimento**, v.20, p. 60-65, 2001.

STUSHNOFF, C.; SEUFFERHELD, M. Cryopreservation of apple (*Malus* species) genetic resource. In: BAJAJ, Y.P.S. eds. **Biotechnology in agriculture and forestry, cryopreservation of plant germplasm I**. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1995. v.32, p.87-101.

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.

WILLIAMS, J.T. Germplasm conservation *in vitro* and cryopreservation. In: TORRES, A C.; CALDAS, L.S. eds. **Técnicas e aplicação da cultura de tecidos de planta**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA/CNPH, 1990. p.267-286.

WITHERS, L. A. Preservation of germplasm. In: WITHERS, L. A. (ed.) **International review of cytology**. Oxford: Oxford University Press, 1980. p.101-136.

WITHERS, L. A. Freeze preservation of cells. In:VASIL, I.K. ed. **Cell culture and somatic cell genetics of plants: laboratory procedures and their applications**. Orlando; Academic Press, 1984. p.608-620.

WITHERS, L.A. Cryopreservation of cultured cells and meristems. In: VASIL, I.K.

(Ed.) **Cell culture and somatic cell genetics of plants: cell growth, nutrition, cytodifferentiation and cryopreservation**. Orlando: Academic Press, 1985a. p. 253-316.

WITHERS, L.A. Cryopreservation of cultured cells and protoplasts. In: KARTHA, K.K., (Ed.) **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton; CRC Press, p.243-267, 1985b.

WITHERS, L.A. In vitro methods for collecting germplasm in the field. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v.69, p.2-6, 1987.

WITHERS, L.A.; WILLIAMS, J.T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPq, 1998. p.297- 330.

Embrapa

Algodão



Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

