

## Manual de Curadores de Germoplasma – Vegetal: Criopreservação

Foto: Antonieta Nassif Salomão



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

## **Documentos 319**

### **Manual de Curadores de Germoplasma – Vegetal: Criopreservação**

Izulmé Rita Imaculada Santos  
Antonieta Nassif Salomão

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Endereço: Parque Estação Biológica - PqEB – Av. W5 Norte (final)

Caixa Postal: 02372 - Brasília, DF - Brasil – CEP: 70770-917

Fone: (61) 3448-4700

Fax: (61) 3340-3624

Home Page: <http://www.cenargen.embrapa.br>

E-mail (sac): [sac@cenargen.embrapa.br](mailto:sac@cenargen.embrapa.br)

**Comitê Local de Publicações**

Presidente: *Lucio Brunale*

Secretária-Executiva: *Lígia Sardinha Fortes*

Membros: *Diva Maria de Alencar Dusi*

*Jonny Everson Scherwinski Pereira*

*José Roberto de Alencar Moreira*

*Regina Maria Dechechi G. Carneiro*

*Samuel Rezende Paiva*

Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*

*Margot Alves Nunes Dode*

Revisor técnico: Alessandra Pereira Fávero

Supervisor editorial: Lígia Sardinha Fortes

Revisor de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica: Lígia Sardinha Fortes

Editoração eletrônica: José Cesamildo Cruz Magalhães

Foto da capa: Antonieta Nassif Salomão

**1ª edição (on line)**

**Todos os direitos reservados.**

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

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

---

Santos, Izulmé Rita Imaculada.

Manual de curadores de germoplasma – Vegetal: Criopreservação. / Izulmé Rita Imaculada Santos e Antonieta Nassif Salomão. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010.

16 p. – (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 319)

Revisão técnica: Alessandra Pereira Fávero.

1. Recursos Genéticos Vegetal – Conservação. 2. Criopreservação. I. Salomão, Antonieta Nassif. II. Título. III. Série.

581.15 - CDD

---

© Embrapa 2010

# **Autores**

**Izulmé Rita Imaculada Santos**

Ph.D. em Fisiologia do Estresse Vegetal, pesquisadora da Embrapa  
Recursos Genéticos e Biotecnologia  
[izulme@cenargen.embrapa.br](mailto:izulme@cenargen.embrapa.br)

**Antonieta Nassif Salomão**

Mestrado em Manejo do Espaço Rural, pesquisadora da Embrapa  
Recursos Genéticos e Biotecnologia  
[antoniet@cenargen.embrapa.br](mailto:antoniet@cenargen.embrapa.br)

# Apresentação

Desde o início da década de 1970, há uma crescente conscientização mundial sobre a necessidade de preservação dos recursos genéticos, que são essenciais para o atendimento das demandas de variabilidade genética dos programas de melhoramento, principalmente aqueles voltados para alimentação.

No Brasil, esta necessidade é especialmente importante, uma vez que a maioria dos cultivos que compõem a base alimentar do país é de origem exótica. Observa-se, por exemplo, que cerca de 95% dos acessos de cereais conservados em coleções do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA) são de espécies exóticas. Portanto, a manutenção e o enriquecimento contínuo da variabilidade genética dessas coleções são prioritários e estratégicos, considerando, ainda, as atuais restrições internacionais ao intercâmbio de germoplasma.

Na década de 1970, a *Food and Agriculture Organization* (FAO), órgão das Nações Unidas, estimulou o estabelecimento de uma rede mundial de centros para a conservação de recursos genéticos situados em regiões consideradas de alta variabilidade genética. Em 1974, o *Consultative Group for International Agricultural Research* (CGIAR) criou o *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR), hoje transformado no *Biodiversity International*. No mesmo ano, a Embrapa reconheceu a importância estratégica dos recursos genéticos com a criação do Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN), que mais recentemente adotou a assinatura-síntese Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A criação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e a consolidação do SNPA estabeleceram ambiente propício para a formatação da Rede Nacional de Recursos Genéticos. A partir de então, paulatinamente, coleções de germoplasma foram estruturadas em diferentes Unidades Descentralizadas, predominantemente na área vegetal.

Em 1993, por intermédio de deliberação da Diretoria Executiva, a Embrapa formalizou, como ferramenta de gestão das coleções, o Sistema de Curadorias de Germoplasma e definiu os papéis e as responsabilidades para os diversos atores envolvidos nesse Sistema, tais como: curadores de coleções de germoplasma, chefes de Unidades Descentralizadas que abrigavam as coleções e a Supervisão de Curadorias. Os projetos em rede foram definidos como figuras programática e operacional, possibilitando o custeio de atividades de coleta, intercâmbio, quarentena, caracterização, avaliação, documentação, conservação e utilização de germoplasma, além da manutenção das coleções. De 1993 até a presente data, muitas coleções de germoplasma foram estabelecidas e, atualmente, o Sistema de Curadorias da Embrapa reúne 209 coleções, incluindo Bancos Ativos de Germoplasma Vegetal (BAGs), Núcleos de Conservação Animal, Coleções Biológicas de Micro-organismos e Coleções de Referência, as quais abrangem espécies nativas e exóticas. Nas

demais Instituições do SNPA, estima-se que são mantidos pelo menos outros 243 Bancos Ativos de Germoplasma Vegetal.

Como duplicata de segurança dos acessos mantidos nos BAGs, a Embrapa Cenargen abriga a Coleção de Base (COLBASE) de germoplasma vegetal, projetada para conservar sementes à temperatura de -20°C por longo período de tempo.

Como consequência desses 30 anos de atividades relacionadas ao manejo dos recursos genéticos, os curadores adquiriram uma bagagem de conhecimentos práticos na área, conhecimentos estes que foram, em parte, sistematizados e disponibilizados para a sociedade por intermédio da presente obra: "Manual de Curadores de Germoplasma".

Esperamos que esta publicação em série torne-se um guia para curadores de germoplasma no Brasil e no exterior, e que contribua efetivamente para o aprimoramento da gestão dos recursos genéticos deste país.

*Mauro Carneiro*

Chefe Geral

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

# Sumário

<b>Introdução</b>	08
<b>Vantagens da criopreservação</b>	09
<b>Utilidades</b>	09
<b>Material vegetativo utilizado</b>	09
Sementes	09
Estruturas vegetativas	10
<b>Crioprotetores</b>	10
<b>Embalagens</b>	11
<b>Desidratação</b>	11
<b>Métodos de criopreservação</b>	11
Congelamento lento	11
Vitrificação	12
Congelamento ultrarrápido	13
Encapsulamento-desidratação	13
Resgate do nitrogênio líquido	14
Avaliação da viabilidade	14
<b>Algumas questões</b>	15
Avaliações periódicas da sobrevivência das amostras	15
Responsável pela criopreservação na Embrapa para o envio de germoplasma a ser conservado	15
Procedimentos para retirada de material	15
<b>Referências</b>	16

# Criopreservação

---

*Izulmé Rita Imaculada Santos*  
*Antonieta Nassif Salomão*

## Introdução

A criopreservação, conservação de material biológico em nitrogênio líquido (-196°C) – (ou em sua fase de vapor a -150°C), é considerada a melhor opção para o armazenamento a longo prazo de germoplasma de espécies de propagação clonal, ou que produzem sementes recalcitrantes ou intermediárias.

As técnicas de criopreservação desenvolvidas ao longo dos últimos 25 anos podem ser efetivamente implementadas para o armazenamento de germoplasma vegetal a longo prazo. Técnicas de congelamento lento, vitrificação, encapsulamento-desidratação, ou a combinação de mais de uma dessas técnicas, estão disponíveis para a conservação de centenas de espécies. Coleções de várias espécies estão armazenadas em criobancos e muitas outras estão sendo estabelecidas em todo o mundo. Coleções de base de germoplasma de espécies de propagação clonal garantem a conservação a longo prazo de uma diversidade genética que é vital para a segurança alimentar e nutricional, assim como para o contínuo melhoramento de muitas espécies agrícolas.

A utilização de técnicas experimentais de criopreservação como técnicas de rotina para a conservação de uma coleção clonal requer atenção para alguns detalhes extremamente relevantes, tais como: escolha dos acessos que serão armazenados; número de acessos por unidade de armazenamento; número de repetições; testes de viabilidade; grupos de controles adequados; e registro seguro e detalhado do material armazenado. Estes cuidados são fundamentais para garantir a segurança e a utilidade da coleção.

A avaliação da estabilidade genética e da integridade biológica do material criopreservado é essencial, como no caso de qualquer outra coleção *ex situ* de germoplasma, para se determinar a longevidade do material e a estabilidade das condições de armazenamento.

## Vantagens da criopreservação

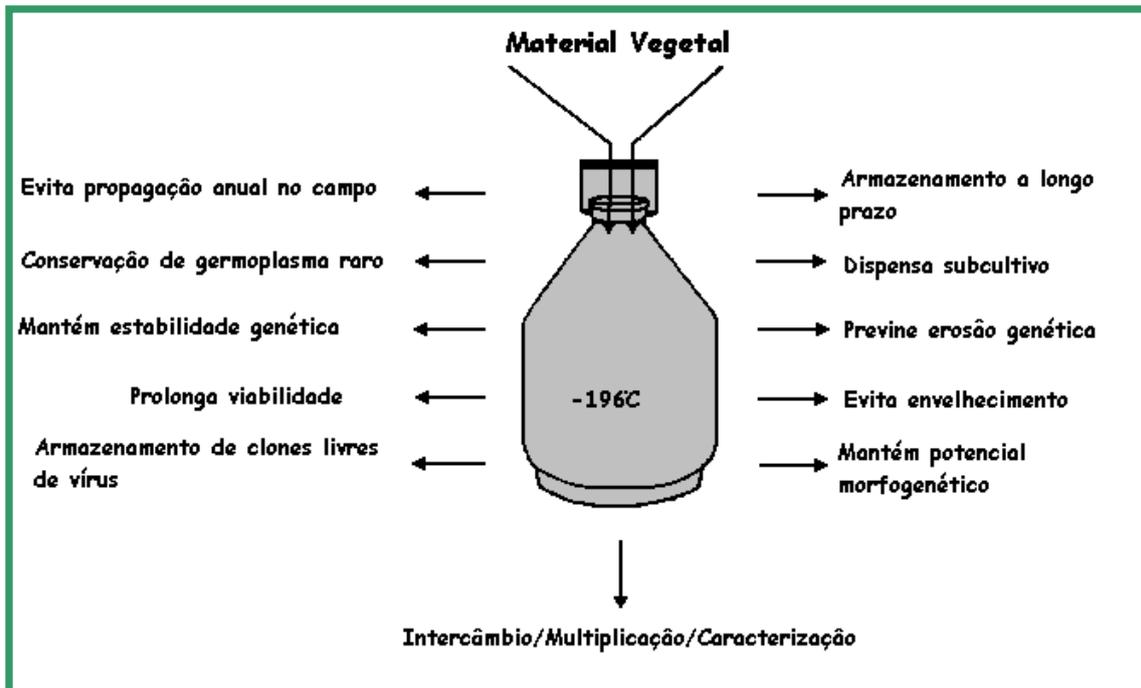


Figura 1. Desenho esquemático que ilustra as vantagens da criopreservação de germoplasma vegetal (© Arte: Izulmé R. I. Santos).

## Utilidades

Utilizada para a conservação de espécies de propagação vegetativa, espécies com sementes recalcitrantes e espécies melhoradas *in vitro* (engenharia genética).

- Custo reduzido: requer manutenção mínima (N<sub>2</sub>L).

## Material vegetal utilizado

Teoricamente, qualquer parte de uma planta pode ser utilizada como amostra. Entretanto, as estruturas vegetativas e reprodutivas mais utilizadas são: sementes, meristemas, ápices caulinares, gemas dormentes (gemas axilares), pólen, embriões somáticos e zigóticos e sistemas *in vitro* (células em suspensão, embriões somáticos, calos). Estes diferentes tipos de estruturas podem ser utilizados da seguinte forma:

### Sementes

Ortodoxas – Estabelecimento de protocolo de criopreservação para sementes inteiras, com até 5 mm<sup>2</sup>.

Intermediárias e recalcitrantes – Estabelecimento de protocolos de criopreservação para eixos embrionários isolados ou germinação *in vitro* de eixos embrionários destinados à multiplicação e produção de lotes de plantas para experimentos de criopreservação.



Foto: Antonieta Nassif Salomão

Figura 2. Sementes de várias espécies nativas, mostrando a variedade de formas e tamanhos.

## Estruturas vegetativas

Ramos, manivas, tubérculos – Isolamento de meristemas, ápices caulinares e gemas laterais a serem utilizados diretamente como explante nos experimentos para o estabelecimento de protocolos de criopreservação, ou para serem cultivados *in vitro* visando à multiplicação clonal e produção de lotes de plantas, as quais serão doadoras de meristemas, ápices caulinares e gemas laterais para os experimentos de criopreservação.

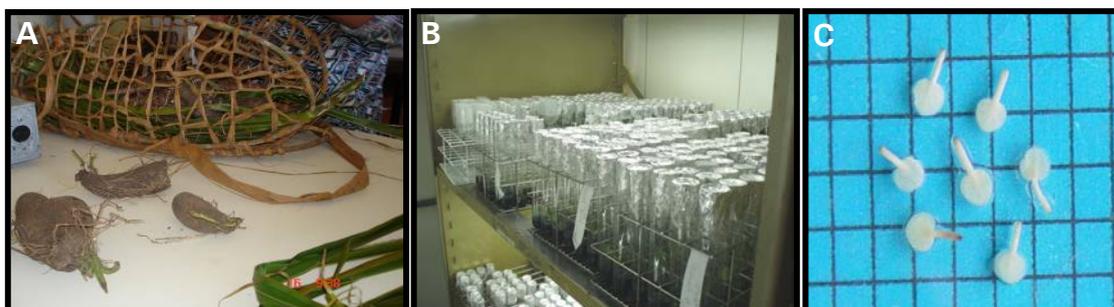


Figura 3. Exemplos de diferentes explantes utilizados no desenvolvimento de protocolos de criopreservação: (A) gemas de tubérculos de cará (*Dioscorea* sp); (B) plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Krantz) produzidas *in vitro*; e (C) eixos embrionários isolados de jenipapo (*Genipa americana*). (© Antonieta N. Salomão e Izulmé R. I. Santos).

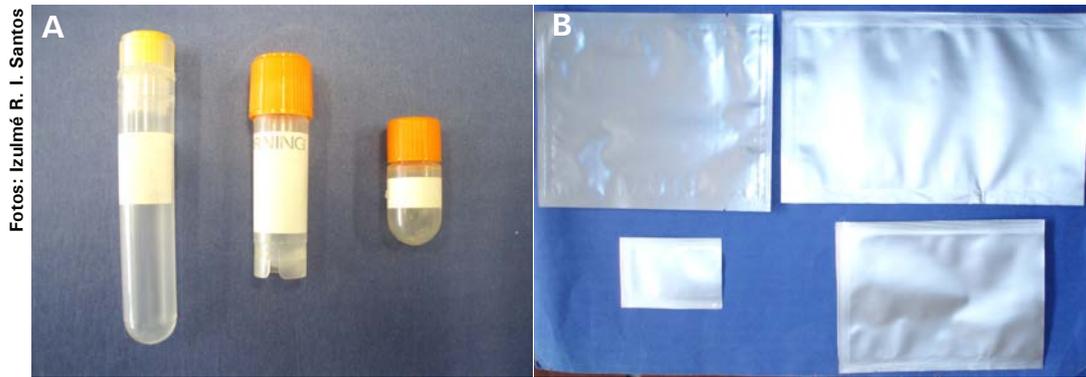
## Crioprotetores

Vários compostos têm sido utilizados como crioprotetores; porém os mais eficientes e mais utilizados são sacarose, glicerol e DMSO. A principal função dos crioprotetores durante o congelamento é reduzir o ponto de congelamento e o congelamento intracelular.

A escolha do crioprotetor depende do tipo de célula a ser preservada. No caso de explantes pequenos ou células isoladas, o glicerol é a melhor escolha por conferir proteção adequada e ser menos tóxico. Entretanto, no caso de explantes maiores e estruturas mais complexas, o DMSO é mais indicado porque tem um maior poder de penetração, sendo geralmente mais eficiente.

## Embalagens

Existe uma grande variedade de embalagens que podem ser utilizadas para acondicionar as amostras a serem criopreservadas. Para células em suspensão, meristemas, ápices caulinares e gemas laterais, os tipos de frascos mais utilizados são os criotubos de plástico com tampa de rosca. Para embalar sementes inteiras, são utilizados envelopes do tipo tetrapak de alumínio e plástico de variados tamanhos, ou mesmo frascos com tampa de rosca, cujo tamanho varia de acordo com o tamanho das sementes.



**Figura 4.** Exemplos de recipientes utilizados para acondicionar as amostras para o congelamento em nitrogênio líquido: (A) criotubos de polipropileno; e (B) envelopes tipo tetrapak de alumínio e plástico.

## Desidratação

A desidratação é uma etapa fundamental no desenvolvimento de um protocolo de criopreservação. Obtém-se a desidratação por meio da exposição da amostra à sílica gel, ao fluxo de ar da cabine de fluxo laminar ou a soluções de sais, pelo período de tempo necessário para se obter o teor de umidade desejado. Estes parâmetros devem ser estabelecidos experimentalmente.

## Métodos de criopreservação

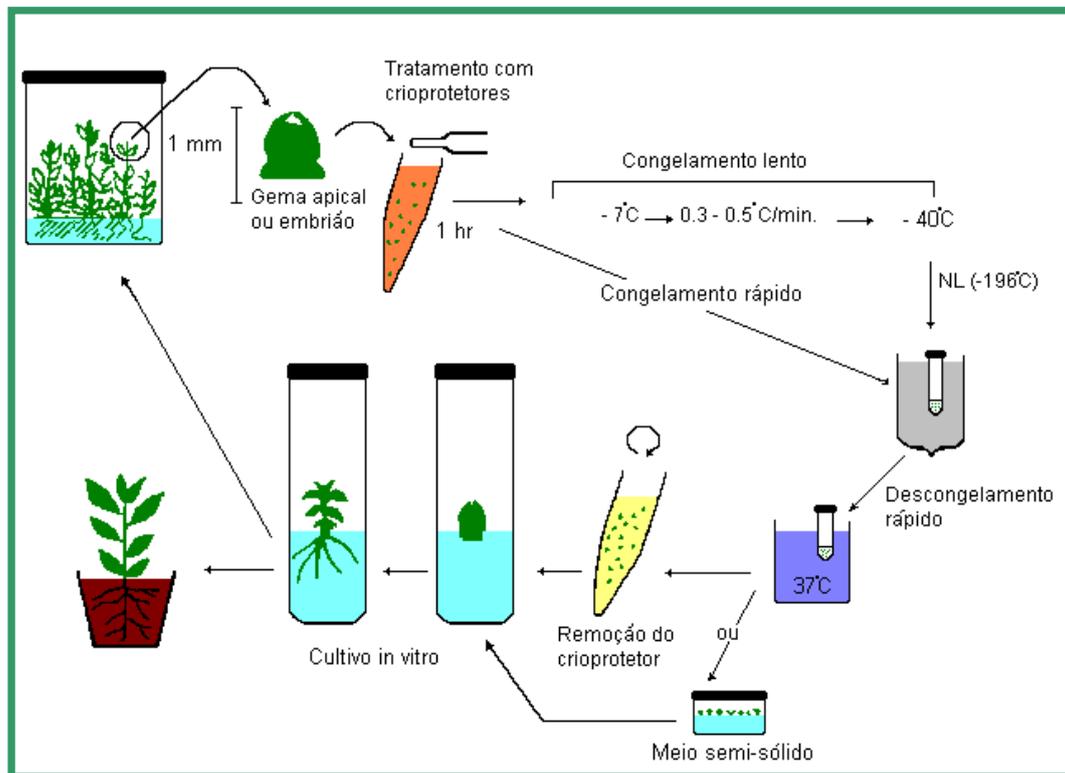
### Congelamento lento

Congelamento gradual utilizando um congelador programável, a uma determinada taxa de congelamento, até uma determinada temperatura (-30 a -40°C) antes da exposição ao nitrogênio líquido (Figura 5). O congelamento lento permite a remoção da maior parte da água livre de dentro das células. É um procedimento complexo e requer um congelador programável, um equipamento bastante caro, o que dificulta a adoção desta técnica por muitos laboratórios.

## Vitrificação

Requer o tratamento dos explantes com soluções extremamente concentradas, as quais contenham teores elevados de crioprotetores como **DMSO**, **EG**, **glicerol** e **sacarose** (Figura 5). Este método foi descrito pela primeira vez por Sakai e colaboradores (1990).

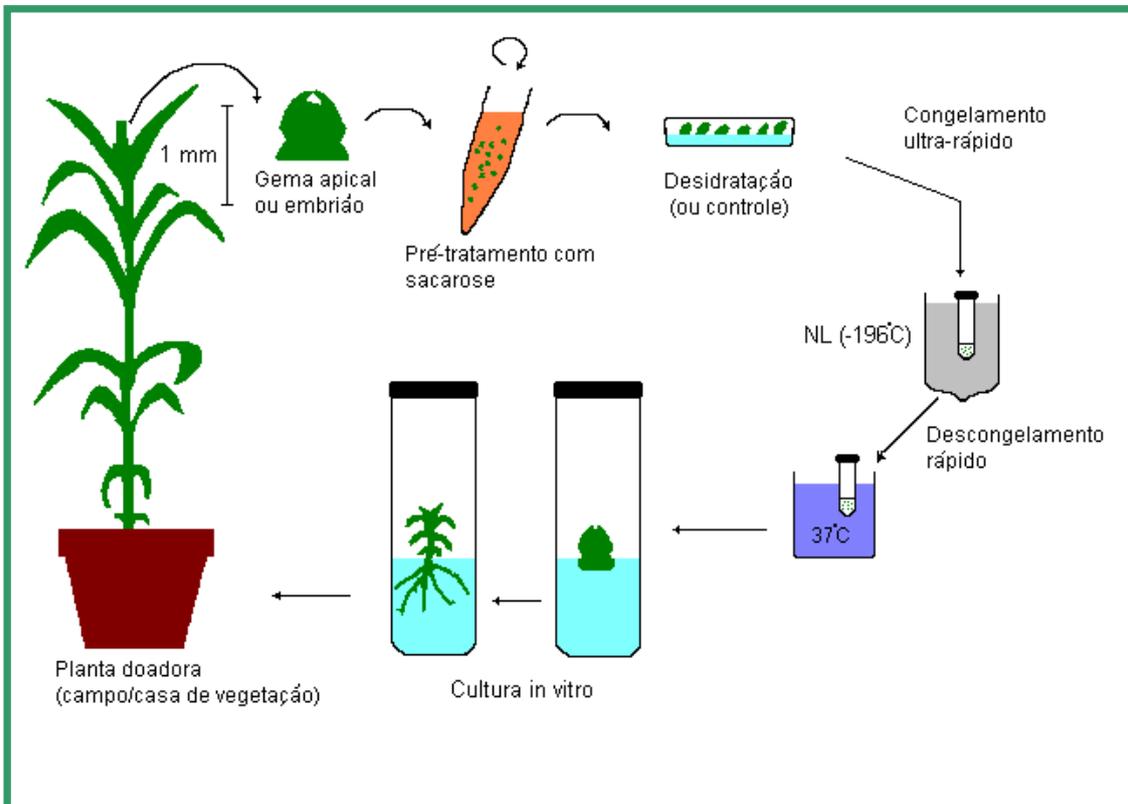
**OBS.:** deve-se utilizar estes reagentes com cuidado, porque eles podem ser tóxicos.



**Figura 5.** Desenho esquemático que ilustra a sequência de etapas dos procedimentos para o congelamento lento e rápido da amostra, após a vitrificação desta com crioprotetores (© Arte: Izulmé R. I. Santos).

## Congelamento ultrarrápido

Promove a desidratação das células antes do congelamento, evitando a formação de grandes cristais de gelo dentro das células (Figura 6). Aplicação ampla para espécies temperadas e tropicais.



**Figura 6.** Desenho esquemático que ilustra a sequência de etapas dos procedimentos para o congelamento ultrarrápido (© Arte: Izulmé R. I. Santos).

## Encapsulamento-desidratação

Compreende o encapsulamento com gel de alginato de sódio, o pré-tratamento com altas concentrações de sacarose e a desidratação antes do congelamento. Este método foi descrito pela primeira vez por Dereuddre *et al.* (1990) em estudos com ápices caulinares de pera. Cria microambiente para o material encapsulado e facilita a absorção de compostos do meio.

Foto: Izulmé R. I. Santos



**Figura 7.** Plântula de café (*Coffea arabica* L.) obtida a partir de eixo embrionário encapsulado, congelado em nitrogênio líquido, após 14 dias de germinação *in vitro*.

## Resgate do nitrogênio líquido

Realiza-se o resgate de amostras congeladas em nitrogênio líquido das seguintes formas:

- descongelamento rápido, em que as amostras são colocadas em um banho-maria a  $\pm 40^{\circ}\text{C}$ ;
- descongelamento lento, em que o material fica exposto à temperatura ambiente por tempo suficiente para promover o completo descongelamento da amostra.

## Avaliação da viabilidade

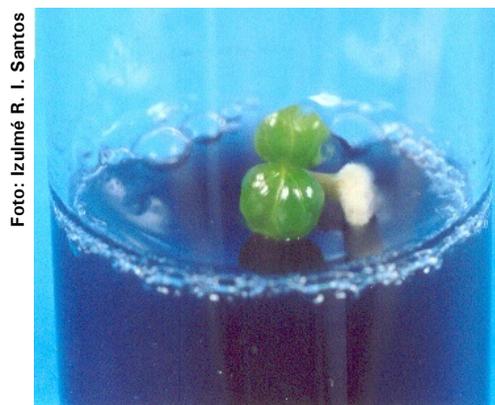
A avaliação da viabilidade das amostras após o congelamento pode ser feita de forma indireta, utilizando-se testes de viabilidade, tais como o teste de tetrazólio, a medida de condutividade elétrica e a microscopia de fluorescência (FDA). Entretanto, obtém-se a prova irrefutável de sobrevivência da amostra com a realização das seguintes técnicas:

- Germinação da amostra (no caso de sementes ou eixos embrionários).



**Figura 9.** Germinação de sementes para avaliação da viabilidade após o congelamento em nitrogênio líquido.

- Regeneração *in vitro* no caso de células em suspensão, meristemas, ápices caulinares ou gemas laterais, em que uma fase de cultivo *in vitro* é essencial.



**Figura 10.** Cultivo *in vitro* de eixos embrionários de café (*Coffea arabica* L.) para avaliação da viabilidade após o congelamento em nitrogênio líquido.

- Enxertia (no caso de ápices caulinares e gemas laterais).

## **Algumas questões**

### **Avaliações periódicas da sobrevivência das amostras**

Recomendam-se avaliações periódicas da estabilidade genética e da integridade biológica, assim como para qualquer outra modalidade de conservação *ex situ*. Entretanto, como a longevidade do material armazenado em nitrogênio líquido é bastante longa, ainda não existe clareza sobre qual seria o intervalo de tempo ideal para a monitoração.

### **Responsável pela criopreservação na Embrapa para o envio de germoplasma a ser conservado**

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia tem um criobanco para armazenamento de grande número de amostras no prédio de coleções que está prestes a ser construído. Para isso, já foi adquirido um criotanque de grande capacidade. No momento, há instalações para realizar experimentos e estabelecer protocolos para os mais variados materiais.

### **Procedimentos para retirada de material**

Valem as mesmas regras que se aplicam à Colbase.

## Referências

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: a alternativa para a conservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 2001.

SANTOS, I. R. I; SALOMÃO, A. N. Criopreservação de germoplasma vegetal. In: Nass, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 545-573, 2007.



---

***Recursos Genéticos e  
Biotecnologia***