



**KILSON PINHEIRO LOPES**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE GERMOPLASMA DE OLEAGINOSAS DE  
IMPORTÂNCIA ECONÔMICA PARA O NORDESTE BRASILEIRO**

**AREIA, PB - BRASIL**

**2005**

**KILSON PINHEIRO LOPES**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE GERMOPLASMA DE OLEAGINOSAS DE  
IMPORTÂNCIA ECONÔMICA PARA O NORDESTE BRASILEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Sementes, para obtenção do título de “Doutor”.

Comitê Orientador

Prof. Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida

Dra. Julita Maria Frota Chagas Carvalho

Profa. Dra. Riselane de L. Alcântara Bruno

**AREIA, PB - BRASIL**

**2005**

Ficha Catalográfica elaborada na Seção de Processos Técnicos da  
Biblioteca Setorial de Areia-PB, CCA/UFPB.

Bibliotecária: Márcia Maria Marques CRB4 – 1409

L864c Lopes, Kilson Pinheiro

Criopreservação de germoplasma de oleaginosas de  
importância econômica para o nordeste brasileiro./ Kilson Pinheiro  
Lopes. – Areia, PB: PPGA/CCA/UFPB, 2005.

131f.: il.

Tese (Doutorado em Agronomia) pelo Centro de Ciências  
Agrárias da Universidade Federal da Paraíba.

Área de concentração: Sementes.

Orientador: Francisco de Assis Cardoso Almeida.

1. Criopreservação - germoplasma - oleaginosas. 2.  
Oleaginosas - criopreservação - germoplasma. 3. Sementes -  
qualidade fisiológica. 4. Algodoeiro - *Gossypium hirsutum* L. 5.  
Mamoneira - *Ricinus communis* L. I. Almeida, Francisco de Assis  
Cardoso (Orientador). II. Título.

CDU: 582.796:582.757(043.2)

**KILSON PINHEIRO LOPES**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE GERMOPLASMA DE OLEAGINOSAS DE  
IMPORTÂNCIA ECONÔMICA PARA O NORDESTE BRASILEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Sementes, para obtenção do título de “Doutor”.

**Banca Examinadora**

---

Dr. Jorge Cazé Filho - EMEPA-PB

---

Dra. Núbia Pereira da Costa - Bolsista DCR-CNPq

---

Prof. Dr. Genildo Bandeira Bruno - UFPB

Prof. Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida  
UFCG  
(Presidente)

Areia, PB, 23 de março de 2005

*Com Carinho,*

*Aos meus queridos e saudosos pais **Manoel Lopes da Silva** (In Memoriam) & **Maria Salete Pinheiro Lopes** (In Memoriam). Hoje, mais que nunca, sinto falta dos seus afagos e de suas orientações para a vida. Sinto-me mais fraco e desprotegido. Busco, nas lembranças, forças para continuar minha luta, que também foi sua.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela maravilha que é, e por demonstrar isto a cada momento de nossas vidas. Ele é o Senhor, foi ele quem nos fez, e não nós; somos povo seu e ovelhas do seu pasto. (Salmo 100,3).

A minha família, com imensa gratidão aos meus queridos pais, que, enquanto presentes, tudo fizeram para que chegasse onde hoje estou. Que Deus os tenham ao seu lado. À minha querida companheira Maria, pelo incentivo, compreensão e dedicação. Que Deus continue nos abençoando.

A Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, e a todos os professores que contribuíram para minha formação.

De modo especial aos meus orientadores: Prof. Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida, Dra. Julita Maria Frota Chagas Carvalho e a Profa. Dra. Riselane de Lucena Alcântara Bruno, pelas orientações, conselhos, incentivos, compreensão, confiança, paciência e sobretudo, pela amizade, sou muito grato por tudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, na pessoa do Prof. Dr. Genildo Bandeira Bruno, pelo apoio, ajuda, compreensão e amizade.

Ao Programa de Capacitação de Profissionais de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro no fornecimento de bolsa de pesquisa.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa do Algodão (Embrapa-Algodão), pelo fornecimento de sementes e por disponibilizar suas instalações durante execução do trabalho. A todos os seus funcionários, em especial a Dione Márcia, pelo auxílio e amizade.

Ao Departamento de Engenharia Agrícola, pela liberação dos equipamentos necessários à realização do trabalho.

Ao amigo Macio Farias de Moura, pelas contribuições nas análises estatísticas e sobretudo, pela grande pessoa que é.

Aos colegas da Pós-Graduação: Adalgisa, Francinelma, Jucilene, Ivonete, Melchior, João e Ricardo Alencar, pela amizade e companheirismo.

Aos colegas de estágio na Embrapa-algodão: Cristiane, Juliana, Valeska, Daniela e Rosemberg, pela convivência e amizade.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização desse trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO DE FIGURAS	
SUMÁRIO DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
CAPÍTULO 1.....	1
1. Considerações Gerais.....	1
2. Revisão de Literatura.....	2
2.1. Importância e Descrição e do Algodoeiro e Mamoneira.....	2
2.1.1. <i>Algodoeiro</i> .....	2
2.2.2. <i>A mamoneira</i> .....	5
2.3. Qualidade Fisiológica da Sementes.....	8
2.3.1. <i>Longevidade e Deterioração</i> .....	8
2.3.2. <i>Manutenção da Viabilidade</i> .....	10
2.4. Conservação de Germoplasma Vegetal – Fundamentos e Definições.....	12
2.5. Criopreservação de Germoplasma Vegetal – Princípios e Metodologias.....	18
2.5.1. <i>Descongelamento Lento</i> .....	19
2.5.2. <i>Vitrificação</i> .....	20
2.5.3. <i>Encapsulamento-dessecação</i> .....	22
2.6. Fatores que Afetam a Sobrevivência à Criopreservação.....	22
2.6.1. <i>Desidratação</i> .....	23
2.6.2. <i>Congelamento</i> .....	24
2.6.3. <i>Descongelamento</i> .....	25
2.6.4. <i>Regeneração</i> .....	26
2.7. Criopreservação de Espécies Vegetais.....	27
Referências Bibliográficas.....	32
CAPÍTULO 2: Criopreservação de Explantes de Algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.) Pelo Método da Vitrificação e Encapsulamento-dessecação.....	49
1 Resumo.....	49
2 Abstract.....	50
3 Introdução.....	51
4 Material e Métodos.....	53
4.1. Material vegetal e procedimentos para obtenção dos explantes.....	53
4.2. Método da vitrificação.....	54
4.2.1. Procedimento estatístico.....	55
4.3. Método do encapsulamento-dessecação.....	56
4.3.1. Procedimento estatístico.....	58
5 Resultados e Discussão.....	58
5.1. Método da Vitrificação.....	58
5.2. Método do Encapsulamento-dessecação.....	65
6 Conclusões.....	76
Referências Bibliográficas.....	77

CAPÍTULO 3: Criopreservação de Eixos Embrionários Zigóticos de Algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.).....	84
1 Resumo.....	84
2 Abstract.....	85
3 Introdução.....	86
4. Material e Métodos.....	88
4.1. Material vegetal e procedimentos para excisão dos eixos embrionários.....	88
4.2. Exposição ao nitrogênio líquido.....	88
4.3. Avaliação da sobrevivência.....	89
4.4. Procedimento estatístico.....	89
5 Resultados e Discussão.....	89
6 Conclusões.....	100
Referências Bibliográficas.....	100

CAPÍTULO 4: Criopreservação de Eixos Embrionários de Mamoneira ( <i>Ricinus communis</i> L.).....	104
1 Resumo.....	104
2 Abstract.....	105
3 Introdução.....	106
4 Material e Métodos.....	109
4.1. Material vegetal e procedimentos iniciais.....	109
4.2. Obtenção dos eixos embrionários.....	110
4.2.1. Procedimento estatístico.....	110
4.3. Criopreservação.....	111
4.3.1. Procedimento estatístico.....	111
5 Resultados e Discussão.....	112
5.1. Obtenção dos Eixos Embrionários.....	113
5.2. Criopreservação.....	120
6 Conclusões.....	126
Referências Bibliográficas.....	126
APÊNDICE.....	131



## SUMÁRIO DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 2	
Figura 1. Criopreservação de explantes de algodoeiro pelo método da vitrificação.....	55
Figura 2. Criopreservação de explantes de algodoeiro pelo método da vitrificação.....	57
Figura 3. Regeneração de explantes de algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.) cultivados <i>in vitro</i> , em função da concentração do dimetilsulfóxido (DMSO), usado como crioprotetor.....	60
Figura 4. Número de brotos emitidos por explantes de algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.) cultivados <i>in vitro</i> , em função da concentração do dimetilsulfóxido (DMSO), usado como crioprotetor.....	61
Figura 5. Comprimento de brotos emitidos por ápices caulinares de algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.) cultivados <i>in vitro</i> , em função da concentração do dimetilsulfóxido (DMSO), usado como crioprotetor.....	62
Figura 6. Comprimento de brotos emitidos por nós cotiledonares de algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.) cultivados <i>in vitro</i> , em função da concentração do dimetilsulfóxido (DMSO) e sacarose, usados como crioprotetor.....	63
Figura 7. Porcentagem de regeneração <i>in vitro</i> de ápices caulinares de algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.), submetidos ao processo de encapsulamento-dessecação.....	70
Figura 8. Porcentagem de regeneração <i>in vitro</i> de nós cotiledonares de algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.), submetidos ao processo de encapsulamento-dessecação.....	71
Figura 9. Número de brotos emitidos por ápices caulinares de algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.), submetidos ao processo de encapsulamento-dessecação.....	72
Figura 10. Número de brotos emitidos por nós cotiledonares de algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.), submetidos ao processo de encapsulamento-dessecação.....	73
Figura 11. Comprimento de brotos emitidos por ápices caulinares de algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.), submetidos ao processo de encapsulamento-dessecação.....	73
Figura 12. Comprimento de brotos emitidos por ápices caulinares de algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.), submetidos ao processo de encapsulamento-dessecação.....	74
CAPÍTULO 3	
Figura 1. Teor de água, em porcentagem, de eixos embrionários oriundos de sementes de algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.) cultivares BRS 200 e BRS 201, submetidos a dessecação em câmaras de fluxo laminar. Barras representam a média de três réplicas em cada tratamento.....	90

Figura 2.	Porcentagem de regeneração de eixos embrionários de algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.), cultivares BRS 200 e BRS 201, em função do tempo de dessecação em câmara de fluxo laminar e do teor de água, sob o armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C).....	92
Figura 3.	Número de raízes emitidas por eixos embrionários de algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.), cultivares BRS 200 e BRS 201, em função do tempo de dessecação em câmara de fluxo laminar e do teor de água, sob o armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C).....	93
Figura 4.	Porcentagem de regeneração de eixos embrionários de algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.) em função do tempo de dessecação em câmara de fluxo laminar e do período de armazenamento em nitrogênio líquido. (A) cultivar BRS 200 e (B) BRS 201.....	96
Figura 5.	Comprimento de plântulas originadas de eixos embrionários de algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.) em função do tempo de dessecação em câmara de fluxo laminar e do período de armazenamento em nitrogênio líquido. (A) cultivar BRS 200 e (B) BRS 201.....	97
Figura 6.	Número de raízes emitidas de eixos embrionários de algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.) em função do tempo de dessecação em câmara de fluxo laminar e do período de armazenamento em nitrogênio líquido. (A) cultivar BRS 200 e (B) BRS 201.....	99

#### CAPÍTULO 4

Figura 1.	Teor de água, em porcentagem, de eixos embrionários oriundos de sementes de mamoneira ( <i>Ricinus communis</i> L.) cultivares BRS 149 - Nordestinas e BRS 188 - Paraguaçu, com e sem embebição em água por 24 horas e dessecadas em câmara de fluxo laminar. Barras representam a média de três réplica em cada tratamento.....	113
Figura 2.	Porcentagem de regeneração de eixos embrionários dessecados e criopreservados a -196°C, por cinco dias, oriundos de sementes de mamoneira ( <i>Ricinus communis</i> L.) com e sem embebição por 24 horas.....	116
Figura 3.	Comprimento de plântulas originadas de eixos embrionários dessecados e criopreservados a -196°C, por cinco dias, oriundos de sementes de mamoneira ( <i>Ricinus communis</i> L.) com e sem embebição por 24 horas.....	118
Figura 4.	Número de raízes por plântulas originadas de eixos embrionários dessecados e criopreservados a -196°C, por cinco dias, oriundos de sementes de mamoneira ( <i>Ricinus communis</i> L.) com e sem embebição por 24 horas.....	120

Figura 5.	Porcentagem de regeneração de eixos embrionários de mamoneira ( <i>Ricinus communis</i> L.) em função do tempo de dessecação em câmara de fluxo laminar e do período de armazenamento em nitrogênio líquido. (A) cultivar BRS 188 - Paraguaçu e (B) 149 - Nordeste.....	122
Figura 6.	Comprimento de plântulas originadas de eixos embrionários de mamoneira ( <i>Ricinus communis</i> L.) em função do tempo de dessecação em câmara de fluxo laminar e do período de armazenamento em nitrogênio líquido. (A) cultivar BRS 188 - Paraguaçu e (B) BRS 149 - Nordeste.....	124
Figura 7.	Número de raízes emitidas de eixos embrionários de mamoneira ( <i>Ricinus communis</i> L.) em função do tempo de dessecação em câmara de fluxo laminar e do período de armazenamento em nitrogênio líquido. (A) cultivar BRS 188 - Paraguaçu e (B) BRS 149 - Nordeste.....	125

## SUMÁRIO DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 2	
Tabela 1. Valores médios de regeneração, número e comprimento de brotos emitidos por explantes de algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.) pré-cultivados com dimetilsulfóxido (DMSO) durante 48 horas.....	60
Tabela 2. Efeito do protocolo de vitrificação na regeneração de ápices caulinares e nós cotiledonares de algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.) antes (-NL) e após (+NL) criopreservação, empregando-se o descongelamento pelo mergulho dos criotubos em água à 38°C por 1-2 minutos (banho maria) e sob condições de ambiente 25±2°C° por 60 minutos (ambiente).....	64
Tabela 3. Teor de água de explantes de algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.) encapsulados com e sem pré-cultivo em meio MS líquido com 0,3 M de sacarose por 24 horas e submetidos a dessecação em câmara de fluxo laminar.....	65
Tabela 4. Valore médios de regeneração, número e comprimento de brotos emitidos de explantes de algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.) submetidos a diferentes etapas do processo de encapsulamento, empregados como testemunhas adicionais.....	67
Tabela 5. Valores médios de regeneração e número de brotos emitidos por explantes de algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.) submetidos ao processo de encapsulamento-dessecação.....	68
Tabela 6. Valores médios de comprimento de brotos emitidos de explantes de algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.) submetidos ao processo de encapsulamento-dessecação, com ou sem pré-cultivo por 24 horas em meio MS líquido com 0,3 M de sacarose.....	69
Tabela 7. Efeito do encapsulamento sem pré-cultivo (MS + 0,3 M sacarose) de explantes de algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.) submetidos a dessecação, sobre sua regeneração antes (-NL) e após (+NL) criopreservação, empregando o descongelamento pelo mergulho dos criotubos em água à 38°C por 1-2 minutos (banho maria) e sob condições de ambiente 25±2°C° por 60 minutos (ambiente).....	76
Tabela 8. Efeito do encapsulamento com pré-cultivo (MS + 0,3 M sacarose) de explantes de algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.) submetidos a dessecação, sobre sua regeneração antes (-NL) e após (+NL) criopreservação, empregando o descongelamento pelo mergulho dos criotubos em água à 38°C por 1-2 minutos (banho maria) e sob condições de ambiente 25±2°C° por 60 minutos (ambiente).....	76

### CAPÍTULO 3

Tabela 1.	Valores médios de regeneração, comprimento de plântulas e número de raízes emitidas por eixos embrionários de duas cultivares de algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.), submetidas ao armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C).....	91
Tabela 2.	Valores médios de regeneração, comprimento de plântulas e número de raízes emitidas de eixos embrionários de algodoeiro ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.) submetidos a dessecação e armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C).....	94

### CAPÍTULO 4

Tabela 1.	Análise de variância da regeneração, comprimento de plântula e número de raízes emitidas por eixos embrionários de duas cultivares de mamoneira ( <i>Ricinus communis</i> L.), após criopreservação em nitrogênio líquido (-196°C), durante cinco dias.....	114
Tabela 2.	Valores médios de regeneração de eixos embrionários de mamoneira ( <i>Ricinus communis</i> L.) cultivar BRS 188 - Paraguaçu, após criopreservação em nitrogênio líquido (-196°C), extraídos de sementes embebida (c/emb) e não embebidas (n/emb) em água, e submetidas a dessecação e imersão em nitrogênio líquido (-196°C), durante cinco dias.....	115
Tabela 3.	Valores médios de regeneração de eixos embrionários de mamoneira ( <i>Ricinus communis</i> L.) cultivar BRS 149 - Nordestina, após criopreservação em nitrogênio líquido (-196°C), extraídos de sementes embebida (c/emb) e não embebidas (n/emb) em água, e submetidas a dessecação e imersão em nitrogênio líquido (-196°C), durante cinco dias.....	115
Tabela 4.	Valores médios de comprimento de plântulas originadas de eixos embrionários de mamoneira ( <i>Ricinus communis</i> L.), extraídos de sementes embebidas (c/emb) e não embebidas (s/emb) em água e, submetidos a dessecação e imersão em nitrogênio líquido (-196°C), durante cinco dias.....	117
Tabela 5.	Valores médios de número de raízes emitidas por eixos embrionários de mamona ( <i>Ricinus communis</i> L.) cultivar BRS 188 - Paraguaçu, extraídos de sementes embebidas (c/emb) e não embebidas (s/emb) em água e, submetidas a dessecação e imersão em nitrogênio líquido (-196°C), durante cinco dias.....	119
Tabela 6.	Valores médios de número de raízes emitidas por eixos embrionários de mamona ( <i>Ricinus communis</i> L.) cultivar BRS 149 - Nordestina, extraídos de sementes embebidas (c/emb) e não embebidas (s/emb) em água e, submetidas a dessecação e imersão em nitrogênio líquido (-196°C), durante cinco dias.....	119

Tabela 7. Valores médios de regeneração, comprimento de plântulas e número de raízes emitidas por eixos embrionários de mamoneira ( <i>Ricinus communis</i> L.) cultivar BRS 149 - Nordestina, submetidos a dessecação e criopreservação em nitrogênio líquido (-196°C).....	121
--	-----

## RESUMO

LOPES, Kilson Pinheiro. **Criopreservação de germoplasma de duas oleaginosas de importância econômica e potencial para o nordeste brasileiro**. Areia: UFPB/CCA, 2005. 128p. (Tese - Doutorado em Agronomia)<sup>1</sup>

A conservação de germoplasma de espécies oleaginosas como o algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) e a mamoneira (*Ricinus communis* L.) é de grande importância para garantir a disponibilidade dos recursos genéticos vegetais para o melhoramento. A criopreservação é vista como ótima alternativa para conservação a longo prazo dos recursos genéticos vegetais. A presente pesquisa foi desenvolvida no Centro Nacional de Pesquisa do Algodão (CNPA) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Laboratório de Biotecnologia, em Campina Grande, PB, com o objetivo de avaliar protocolos de criopreservação para o algodoeiro e a mamoneira. Foram utilizadas sementes de algodoeiro das cvs. BRS 200 e BRS 201 e da mamoneira cvs. BRS 188 - Paraguaçu e BRS 149 - Nordestina para a obtenção de seus eixos embrionários e de plântulas matrizes para excisão dos explantes (ápices caulinares e nós cotiledonares). Dentre as técnicas de criopreservação, foram avaliados protocolos de vitrificação e encapsulamento-dessecação para explantes de algodoeiro e dessecação de eixos embrionários do algodoeiro e da mamoneira. Na vitrificação, empregou-se o dimetilsulfóxido (0; 5; 10; e 15%) e/ou sacarose (0; 0,1; 0,25 e 0,5 M) no meio MS de pré-cultivo dos explantes por 48 horas. No encapsulamento-dessecação, explantes de algodoeiro foram pré-cultivados em MS com 0,3 M de sacarose por 24 horas e mergulhados na solução de encapsulamento com alginato de sódio a 3%; explantes encapsulados foram transferidos para cultivo em MS com 0,75 M de sacarose durante 12 horas sob 130 rpm e então submetidos a dessecação por 0; 3; 6 e 9 horas na câmara de fluxo laminar, com posterior determinação do teor de água. No procedimento de dessecação dos eixos embrionários, sementes de algodoeiro e mamoneira foram submetidas a embebição por 24 horas para posterior extração dos eixos embrionários na câmara de fluxo laminar, onde eixos permaneceram dessecando por 0; 30; 60 e 90 minutos após extração, com posterior determinação do teor de água. Em todos experimentos foram empregadas quatro réplicas de 10 unidades experimentais, que foram postas em criotubos e imersos no nitrogênio líquido (-196°C), onde permaneceram por 0; 5; 30 e 60 dias. Ao final de cada período, o descongelamento das amostras foi realizado rapidamente (38±2°C por 1-2 min) e lentamente (25±2°C por 60 min) e então cultivadas *in vitro* durante quatro semanas, momento em que se realizou a análise de viabilidade dos explantes de algodoeiro e eixos embrionários de ambas espécies. A dessecação dos eixos embrionários de algodoeiro por 60 minutos (16% do teor de água) e da mamoneira por 90 minutos (5% do teor de água), quando obtidos de sementes embebidas, garantiu regeneração após criopreservação. O emprego do dimetilsulfóxido acima de 5% afetou a viabilidade dos explantes. O encapsulamento induziu uma redução no desenvolvimento dos explantes e a dessecação afetou a regeneração. A vitrificação e o encapsulamento-dessecação não garantiram regeneração aos explantes de algodoeiro criopreservados.

---

<sup>1</sup> Comitê Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida – UFPB (Orientador), Dra. Julita Maria Frota Chagas Carvalho – EMBRAPA/CNPA, Prof<sup>ª</sup>. Dra. Riselane de Lucena Alcântara Bruno – UFPB/CCA.

## ABSTRACT

LOPES, Kilson Pinheiro. **Cryopreservation of germplasm of two oleaginous of economical and potential importance for the Brazilian northeast.** Areia: UFPB/CCA, 2005. 128p. (Thesis - Doctorate in Agronomy)\*<sup>2</sup>

The conservation of germplasm of oleaginous species of the cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and the castor bean (*Ricinus communis* L.) it is of great importance to guarantee the readiness of the resources genetic vegetables for the improvement. The cryopreservation is seen as great alternative for conservation long term of the resources genetic vegetables. To present research it was developed in the National Center of Research of the Cotton (CNPA) of the Brazilian Company of Agricultural Research (EMBRAPA), Laboratory of Biotechnology, in Campina Grande, PB, with the objective of evaluating cryopreservation protocols for the cotton and the castor bean culture. Cotton seeds were used of the you cvs. BRS 200 and BRS 201 and of the castor bean seeds of the cvs. BRS 188 - Paraguaçu and BRS 149 - Nordeste for the obtaining of your embryonic axes and of the plantlets for the excision of the explants (shoot apices and nod cotiledonare). Among the cryopreservation techniques, they were appraised protocols of vitrification and encapsulation-dehydration for cotton explants and desiccation of embryonic axes of the cotton and of the castor bean culture. In the vitrification, the DMSO was used (0; 5; 10; and 15%) and/or sucrose (0; 0,1; 0,25 and 0,5 M) in the preculture of the explants for 48 hours. In the encapsulation-dehydration, explants were submitted or not to the preculture for 24 hours MS liquid medium supplemented with 0,3 M of sucrose and dived in the encapsulation solution, containing 3% of Na-alginate, forming a bead that involved the explant, which were maintained by 12 hours in MS liquid medium with 0,75 M of sucrose, on a rotary shaker at 130 rpm. The beads containing the explants was submitted to the desiccation by 0; 3; 6 and 9 hours in the flow camera to laminate, with subsequent determination of the content of water. In the procedure of desiccation of the embryonic axes, cotton and castor bean seeds they were submitted the imbibition in water for 24 hours for subsequent extraction of the embryonic axes in the flow camera to laminate, where axes stayed desiccation for 0; 30; 60 and 90 minutes after extraction, with subsequent determination of the content of water. In all experiments the explants they were them placed in cryotubes and directly plunged into liquid nitrogen (-196°C), during 0; 5; 30 and 60 days. At the end of each period, the thawing of the explants was accomplished fast (38±2°C for 1-2 min) and slowly (25±2°C for 60 min) and then cultured in vitro for four weeks, moment in that took place them analysis of viability of the cotton explants and embryonic axes of both species. The desiccation of the cotton embryonic axes for 60 minutes (16% of the content of water) and of the castor bean for 90 minutes (5% of the content of water), when obtained of imbibed seeds, it guaranteed regeneration after cryopreservation. The employment of the DMSO above 5% affected the viability of the explants. The encapsulation induced a reduction in the development of the explants and the desiccation it affected the regeneration. The vitrification and the encapsulation-dehydration didn't guarantee regeneration of the cotton explants cryopreserved.

---

\* Guidance committee: Prof. Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida – UFCG/CCT (Orientador), Dra. Julita Maria Frota Chagas Carvalho – EMBRAPA/CNPA, Prf<sup>a</sup>. Dra. Riselane de Lucena Alcântara Bruno – UFPB/CCA.



# CAPÍTULO 1

## 1 Considerações Gerais

Os programas de melhoramento são responsáveis pelo desenvolvimento e lançamento de cultivares, para atender às necessidades dos agricultores. Para o desenvolvimento dessas cultivares, é fundamental a existência de bancos de germoplasma que representem, significativamente, a variabilidade genética da espécie, cujos recursos genéticos possam ser facilmente obtidos.

Tradicionalmente, as espécies vegetais vêm sendo conservadas *ex situ*, como plantas vivas mantidas em coleções de germoplasma a campo que, no entanto, apresentam uma série de problemas, como erosão genética das espécies e variedades, devido a pouca adaptação às condições ambientais desses locais, ataque de pragas e doenças, além de envolverem um grande custo financeiro e de mão-de-obra. Uma outra forma de conservação de germoplasma é por meio da manutenção de sementes, principal via de propagação das espécies de plantas superiores, em câmaras frigoríficas, com controle de temperatura e umidade relativa. Essa técnica apresenta-se mais adequada; contudo, não garante a conservação a longo prazo, exigindo espaço físico apropriado e avaliações periódicas da viabilidade do material armazenado; assim, o desenvolvimento de técnicas alternativas de conservação, a longo, prazo dos recursos genéticos apresentam grande importância para os avanços do melhoramento vegetal.

A biotecnologia moderna apresenta novas possibilidades para a conservação de recursos genéticos de espécies vegetais, usando-se técnicas de conservação *in vitro*, sob crescimento lento, ou crioconservação, que vêm tornando-se imprescindíveis para a conservação *ex situ* e, ainda, o intercâmbio de germoplasma das espécies propagadas vegetativamente, que se degradam rapidamente no armazenamento ou que possuem sementes recalcitrantes.

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) e a mamoneira (*Ricinus communis* L.), são, em particular, espécies oleaginosas de comprovada importância econômica para o País. Apresentam sementes muito susceptíveis a danos fisiológicos devido à instabilidade química dos lipídios, que se deterioram mais rapidamente durante o armazenamento convencional, aliado à presença de

microrganismos que contribuem na aceleração desse processo, exigindo avaliações periódicas do material vegetal, para evitar eventuais perdas da variabilidade genética, principalmente quando mantidas em bancos de germoplasmas.

A procura da solução ao problema referenciado, buscou-se definir metodologias viáveis e simplificadas de conservação, a longo prazo, do germoplasma do algodoeiro e da mamoneira, por meio da crioconservação. Para tanto, faz-se necessário a elaboração e avaliação de protocolos que permitissem o alcance do objetivo proposto.

Com base na revisão, a atenção se voltou de imediato para as técnicas de vitrificação e encapsulamento-dessecação, que dispensam o uso de equipamentos sofisticados e se apresentam adequados para a crioconservação de ápices e meristemas. Dependendo da espécie, alguns crioprotetores químicos empregados, podem apresentar citotoxicidade e causar alterações indesejáveis durante cultura. Para tanto, busca-se obter um protocolo que possa garantir sua viabilidade criobiológica, procurou-se, estudar, também, um protocolo que eliminasse o emprego de agentes químicos, buscando apenas reduzir o conteúdo de água presente nas células das estruturas vegetais, principal fator limitante na crioconservação, por meio da dessecação em ar estéril.

## **2 Revisão de Literatura**

### **2.1 Importância e Descrição do Algodoeiro e da Mamoneira**

#### **2.1.1 O algodoeiro**

A cadeia produtiva do algodão (*Gossypium hirsutum* L.) é uma das principais do Brasil e do mundo. Mais de 150 países produzem ou consomem algodão em pluma, cerca de 20 milhões de toneladas por ano, ou 90 milhões de fardos internacionais de 217,7 kg de algodão em pluma. O Brasil ultrapassou os 4,6 milhões de hectares plantados com algodão, como na safra 1971/72, que representava quase 14% do total mundial e, também, a produzir um milhão de toneladas de pluma, a exemplo da safra 1984/85, quando o consumo era de menos de 500.000 toneladas, embora tenha chegado a quarto exportador mundial de algodão, empregando mais de um milhão de pessoas diretamente, apenas nos

setores industriais e gerando, somente na indústria, mais de US\$ 1,5 bilhões por ano, considerando o nosso país (BELTRÃO, 1999).

No semi-árido nordestino brasileiro, a cultura do algodão foi, e continua sendo, uma das principais atividades de grande importância socioeconômica da região, seja na oferta de matéria-prima para a indústria têxtil e oleaginosa, seja na geração de emprego e renda, onde a cultura é explorada em sua grande maioria por pequenos e médios agricultores, apresentando baixo nível de produtividade (BELTRÃO, 2003). A região Nordeste já chegou a plantar mais de um milhão de hectares com algodão, como na safra 1984/85 tendo, atualmente, 188.000 ha plantados, principalmente nos estados da Bahia (55.000 ha), Ceará (29.000 ha) e Alagoas (21.000 ha) com plena possibilidade de crescimento e desenvolvimento, via plataformas do algodão e programas de recuperação dessa cultura no semi-árido de todos os Estados que compõem a referida região (ARAÚJO *et al.*, 2003).

Vários estudos vêm sendo realizados por instituições de pesquisa, com o intuito de lançar cultivares de algodão com características que possam garantir a produção em condições ambientais adversas e oferecer matéria-prima de qualidade para a indústria têxtil e oleaginosa. Dentre esses novos avanços, destaca-se o algodão colorido. Segundo Freire (1999), já foram identificadas várias espécies silvestres de algodão com fibras coloridas em tonalidades verde, amarela, azul e cinza. Por meio do melhoramento vegetal, foram lançadas, pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária no Centro Nacional de Pesquisa do Algodão EMBRAPA-Algodão, duas cultivares comerciais de algodão de plumas coloridas: o algodão BRS 200 de fibra marrom e o algodão BRS-Verde.

O algodão colorido foi desenvolvido pelos Incas e Astecas, há 4.500 anos, e por outros povos antigos das Américas, Ásia, África e Austrália. Esses algodões de fibras coloridas foram, durante longos períodos, descartados pela indústria têxtil mundial e até mesmo proibida sua exploração em vários países, por serem considerados contaminantes indesejáveis dos algodões de tonalidade branca normal (FREIRE, 1999).

Atualmente, a região Nordeste é a mais indicada para a exploração desse algodoeiro garantindo, com isso, melhores perspectivas para a região, uma vez que os preços obtidos com o algodão colorido, no mercado internacional, variam de US\$ 3,79 a US\$ 5,00/kg de fibra verde e de US\$ 1,84 a US\$ 3,35/kg de fibra marrom, o que propicia alta margem de lucro aos produtores, quando comparado

com o algodão de fibra branca, que alcança preços médios de US\$ 1,65/kg de fibra. Segundo Freire (1999), o mercado para o algodão colorido ainda é restrito, sendo o produto consumido por pessoas alérgicas a corantes sintéticos, grupos ambientalistas e Organizações Não Governamentais (ONGs) que desenvolvem trabalhos com agricultura orgânica.

Os avanços obtidos com o algodão colorido, decorreram da exploração do germoplasma natural do algodão, por meio de métodos tradicionais de melhoramento genético. O uso das técnicas de biologia molecular sobre transferência de genes que controlam a expressão de várias tonalidades de cores, das espécies selvagens de algodão para as cultivares modernas, já constitui um dos objetivos das empresas de biotecnologia que trabalham com algodão no mundo, o que pode resultar em avanços tecnológicos e em economia de tempo e recursos na obtenção das futuras cultivares de algodão colorido (FREIRE *et al.*, 1997).

O homem tem externado grande interesse em encontrar métodos adequados de armazenamento para aumentar o tempo de conservação da qualidade das sementes. Condições capazes de mantê-las viáveis e vigorosas por longos períodos de tempo, são de grande importância para os três segmentos da cadeia do algodão: produtores, beneficiadores (maquinistas) e indústria.

A semente, principal via de propagação do algodoeiro, é coberta com línter, constituída de fibras pequenas (8 a 12% do peso da semente) aderida ao tegumento. O tegumento é a estrutura externa que delimita a semente e provém do integumento do óvulo; suas funções básicas são manter as unidades internas, protegendo a semente de danos mecânicos, microrganismos patogênicos, regular a reidratação, trocas gasosas e, sobretudo, a germinação, causando a dormência. Sob o tegumento aparece a amêndoa, formada pelo embrião e tecidos de reserva. A amêndoa é de natureza oleaginosa, com cerca de 25 a 40% de óleo, repleta de glândulas de pigmento em que o principal deles é um alcalóide chamado gossipol; o embrião é a parte vital da semente, com a função de reiniciar a divisão celular e de crescer. Como na maioria das espécies, o embrião da semente de algodoeiro é um eixo constituído de epicótilo, hipocótilo e radícula (VIEIRA e BELTRÃO, 1999). De acordo com Mauney (1984) na semente dormente e/ou quiescente, o eixo primário consiste de radícula, hipocótilo e epicótilo pobremente desenvolvido. O epicótilo possui uma folha verdadeira inicial

e o meristema apical que, após o crescimento e desenvolvimento inicial, origina a fitomassa aérea da plântula a qual possui dois cotilédones, que caracterizam o estágio inicial do crescimento.

O poder germinativo da semente está, em geral, relacionado à sua idade. Dependendo da umidade da semente e das condições ambientais (temperatura e umidade relativa) de armazenamento, o poder germinativo se conserva por longos períodos. Sementes armazenadas durante 15 anos, a 11% de umidade e 1°C de temperatura alcançaram germinação de 93% (SIMPSON *et al.*, 1953). Segundo Popinigis (1977) as sementes de algodão herbáceo apresentam melhores qualidades por ocasião da maturação fisiológica, que ocorre entre 40 a 45 dias após a antese; a partir desse ponto, o poder germinativo e o vigor declinam em intensidade variável, dependendo das condições a que essas sementes ficam sujeitas durante os processos pós-colheita. O algodão requer, como oleaginosa, teor de umidade ao redor de 9% para o armazenamento, condição obtida em ambiente, quando a umidade relativa do ar se encontra a 60% e a temperatura em torno de 25°C (SASSERON, 1980).

### **2.1.2 A mamoneira**

A mamoneira (*Ricinus communis* L.), também denominada, no Brasil, carrapateira, palma-crísti e enxertia; em espanhol, *higuerilla*, *higuerete*, *palma christi*, *higuera* e *tártago*; em francês, *ricinus*; em inglês, *castor bean* e *castor seed* e, em alemão, *wunder-baun*, é uma das 7.000 espécies da família das euforbiáceas, possivelmente originária da Etiópia, no continente africano (BELTRÃO *et al.*, 2001).

Há algum tempo, décadas de 70 e 80 do século passado, o Brasil foi um dos maiores produtores dessa euforbiácea no mundo, chegando a colocar, nos mercados interno e externo, anualmente, cerca de 200 mil toneladas, com produtividades variando entre 800 a 1200 kg.ha<sup>-1</sup> de bagas (SANTOS *et al.*, 2001), que representava mais de 60% da produção mundial. É uma cultura que tem vários produtos e co-produtos, destacando-se o óleo, único glicerídeo que a natureza concebeu em mais de 32.000 espécies de espermatófitas, que é solúvel em álcool, e a torta, produto da extração do óleo, rica em fibra (mais de 35%), e cerca de 5% de nitrogênio, sendo um excelente fertilizante e condicionante do

solo e, caso seja tornada atóxica, torna-se-á excelente fonte protéica para rações animais (BELTRÃO *et al.*, 2003).

Segundo Beltrão *et al.* (2003) a diminuição da produção brasileira de mamona ocorreu devido a uma série de fatores estruturais e conjunturais, internos e externos, que levaram à redução significativa na área plantada e no volume da produção. O mercado para a ricinoquímica é pequeno e oligopsônico no Brasil, de forma que qualquer pequeno excesso de oferta causa grande queda no preço (AZEVEDO e LIMA, 2001).

Atualmente, com a possibilidade do óleo de mamona ser matéria prima para a produção de biodiesel, há grande possibilidade de se ampliar as áreas de plantio e melhorar a produtividade mediante inovações técnicas e tecnológicas de exploração, em especial na Região Nordeste. O óleo da mamona é um dos melhores produtos para tal finalidade, em função das suas características singulares, entre elas maior densidade, solubilidade em álcool, cerca de 5% de oxigênio a mais na molécula, aliados aos seus novos usos na química fina, com mais de 700 produtos manufaturados, e a cada dia surgindo novos produtos (BELTRÃO *et al.*, 2003).

Por se tratar de uma espécie polimórfica, a mamoneira apresenta grande variação no hábito de crescimento, cor da folhagem e caule, tamanho das sementes, conteúdo de óleo e coloração, e porte (altura das plantas), apresentando-se como uma planta perene, quando as condições ambientais, sobretudo temperatura e umidade, o permitem (WEISS, 1983; ANJANI *et al.*, 1999).

O fruto da mamona é uma cápsula de coloração verde ou vermelha, que pode ser lisa ou com estruturas semelhantes a espinhos. No amadurecimento pode apresentar deiscência ou não, e pode liberar as sementes, dependendo do nível de deiscência. A semente, por sua vez, é muito variável na cor, forma, tamanho, peso, proporção do tegumento, presença ou ausência de carúncula e maior ou menor aderência do tegumento ao endosperma (MAZZANI, 1983). O tegumento externo da semente é representado pela casca dura e quebradiça, tendo ainda uma película interna, fina, que envolve o albúme, que é branco, compacto e rico em óleo (RIBEIRO FILHO, 1966).

A semente apresenta dormência que varia entre cultivares e entre racemos (LAGO *et al.*, 1979) tornando-se quase nula após nove meses de

armazenamento, independente da cultivar porém, com o revolvimento da carúncula e parte do tegumento, o processo de germinação das sementes pode ser acelerado (WEISS, 1983; OLIVEIRA *et al*, 2004; QUEIROZ *et al.*, 2004); no entanto, Gurgel (1952) realizando experiências para testar a influência da carúncula na germinação de sementes velhas e novas de *Ricinus*, concluiu que a presença de tal estrutura tem papel irrelevante no processo.

As substâncias de reserva que nutrem o embrião nas fases iniciais de germinação estão no endosperma, tecido triplóide, que contém, aproximadamente 18% de proteínas e 64% de óleo (STREET e OPIK, 1974) sendo a fonte de energia e aminoácidos para o embrião, após o processo de digestão (ESAU, 1974). Os limites térmicos da germinação das sementes da mamoneira, segundo Weiss (1983) são de 14°C (mínimo) e de 36°C (máximo). No processo de embebição a semente absorve de 28 a 32% de água e inicia a hidrólise das macromoléculas para a nutrição do embrião, em que parte do óleo armazenado é consumido no processo de respiração celular, após ser transformado em carboidratos. O conteúdo de óleo começa a decrescer após o terceiro dia da germinação e continua até o 14<sup>o</sup> dia, de acordo com Sevast'yanova (1986).

A conservação de sementes oleaginosas, como é o caso da mamona, é dificultada em função de sua constituição química. Segundo Vertucci (1989) e Almeida *et al.* (2000) sementes com maior quantidade de lipídios parecem ser mais susceptíveis a tal prática dificultando, assim, a conservação de germoplasma, pelos métodos convencionais de armazenamento.

## **2.3 Qualidade Fisiológica da Semente**

### **2.3.1 Longevidade e Deterioração**

Para que um lote de sementes tenha máxima qualidade, é necessário que a colheita seja realizada o mais próximo possível da sua maturidade fisiológica, quando, geralmente, a semente está em condições de máximo vigor (ELLIS e PIETA FILHO, 1992) e deste ponto deterioram, gradativamente, até perder finalmente a viabilidade. Evidências comprovam que os agentes deteriorativos estão normalmente associados ao aumento ou diminuição na atividade de um determinado grupo de enzimas, além de alterações em componentes de reservas, como queda na síntese e conteúdos de proteínas, variações na disponibilidade e na estrutura de carboidratos, diminuição no conteúdo total de lipídios e aumento de ácidos graxos livres. São destacadas ainda outras evidências como alterações em propriedades de membranas e atividade respiratória, diminuição na síntese e degradação de DNA e acúmulo de produtos tóxicos nas células (BASRA, 1994; COPELAND e McDONALD, 1995; McDONALD, 1999).

A deterioração em sementes é considerada qualquer mudança degenerativa irreversível, após cada lote ter atingido níveis máximos de qualidade. Para Abdul-Baki e Anderson (1972), a deterioração é o resultado de alterações de natureza fisiológica e bioquímica, embora os mecanismos responsáveis por essas modificações celulares estejam sendo, ainda, elucidados. Contudo, as manifestações de deterioração têm sido evidenciadas pela redução no crescimento ou no vigor das plântulas, maior suscetibilidade a ataques de microrganismos patogênicos, emergência desuniforme e redução na produtividade (DELOUCHE e BASKIN, 1973).

Segundo Ellis (1991) e Braccini *et al.* (2001), a deterioração ou envelhecimento de sementes envolve uma seqüência de eventos bioquímicos e fisiológicos, que levam a um progressivo declínio na qualidade de sementes e, finalmente, à perda da viabilidade. Sementes são consideradas não viáveis quando não germinam sob condições ambientes favoráveis após quebra da dormência. A sensibilidade das sementes ao processo de deterioração, em determinado ambiente, tem sido atribuída à constituição genética. Existem diferenças entre as espécies, entre as cultivares dentro de uma mesma espécie e entre as sementes de um mesmo lote (ROOS, 1982; POPINIGIS, 1985).



Dentre as diversas manifestações fisiológicas da deterioração das sementes, destacam-se as mudanças na sua coloração, atraso na germinação, decréscimo na tolerância a condições ambientais sub-ótimas durante a germinação, baixa tolerância às condições adversas no armazenamento, alta sensibilidade aos tratamentos com radiação, redução no crescimento das plântulas anormais e impacto dos microrganismos (VAN PIJLEN *et al.*, 1995). A taxa de deterioração é influenciada pela condição ambiental, como também por fatores biológicos que envolvem a interação com microrganismos. A redução na capacidade germinativa e a influência de microrganismos, têm sido considerados os mecanismos de deterioração mais aceitos e difundidos., dentre estes os danos às membranas celulares seria a causa fundamental. Biologicamente, fungos de armazenamento aceleram a perda em qualidade das sementes, reduzindo a germinação separadamente das causas fisiológicas da deterioração (GOSH e NANDI, 1986; KONONKOV e DUDINA, 1988; MYCOCK e BERJAK, 1995). A peroxidação dos lipídios, os danos genéticos, as mudanças na respiração das sementes, as modificações na atividade enzimática e síntese protéica, o acúmulo de substâncias tóxicas, dentre outros, são manifestações bioquímicas (ABDUL-BAKI e ANDERSON, 1972).

Outra corrente de pesquisa relaciona os danos genéticos como sendo os principais, causando aberrações em cromossomos ou cromátides, estando evidenciado que a perda da viabilidade, está correlacionada à extensão com que ocorre este tipo de dano (ROBERTS, 1988). Segundo McGree (1983) parece haver um acúmulo de mutações indesejáveis com o aumento na idade do tecido que, por fim, conduzem a disfunções metabólicas. Há de considerar, nesse processo, que a severidade dos danos genômicos, assim como a taxa de perda de viabilidade, estão diretamente relacionados à temperatura, ao acúmulo de umidade e ao tempo de armazenamento das sementes. Portanto, os mecanismos de deterioração não são mutuamente exclusivos. Um conjunto de mecanismos ou de fatores pode estar interagindo no decorrer do processo (CHRISTENSEN, 1972; COPELAND, 1976; MATTHEWS, 1985; RAO *et al.*, 1987; BEWLEY e BLACK, 1994).

Segundo Colbear (1995), as danificações ao genoma são causas primárias de deterioração. Um pequeno dano pode resultar no acúmulo de pontos de mutação, que podem afetar a morfologia ou o funcionamento das plantas em um

estádio mais avançado de crescimento. Pode ocorrer desenvolvimento de plântulas anormais ou esterilidade de grãos de pólen ou, então, a perpetuação de genes recessivos para gerações futuras.

Normalmente, os mecanismos descritos na literatura são gerais; eles ocorrem em espécies com características fisiológicas e bioquímicas bastante distintas. Segundo Nkang *et al.* (2000), a seqüência de eventos metabólicos, que atua no sentido de provocar alterações que conduzem a morte de células, tecidos e organelas, parece ter início ainda na fase jovem do organismo. Um bom exemplo é a peroxidação de lipídios, que pode ocorrer logo após dessecação, sendo de extrema importância para espécies que contêm sementes com elevada quantidade de óleo em sua constituição, como a soja, a mamona e o algodão (HARRINGTON, 1972; FREITAS, 1978; BRACCINI *et al.*, 2001).

### **2.3.2 Manutenção da viabilidade**

Delouche e Baskin (1973) esclarecem ainda que, a deterioração de sementes pode ser caracterizada como um processo inevitável, sendo, no entanto, possível retardar a taxa de deterioração por meio de práticas que conduzam à um ótimo armazenamento.

É possível manter ou prolongar a viabilidade das sementes, quando armazenadas em condições controladas de temperatura e suprimento do oxigênio, porque há redução ou interrupção dos mecanismos deletérios à semente, sobretudo produção de metabólitos essenciais, decomposição de macromoléculas e acúmulo de metabólitos tóxicos (STANWOOD, 1985b). Outro fator que determina a manutenção da viabilidade da semente, durante o armazenamento, é o conteúdo de umidade, visto que baixos conteúdos de umidade reduzem a formação de gelo nas estruturas intracelulares da semente, quando expostas às temperaturas subzero atenuando, assim, possíveis danos decorrentes do congelamento (ROBERTS, 1973a).

A deterioração, segundo Delouche e Baskin (1973), pode também ser considerada um processo irreversível, porém alguns mecanismos de pré-condicionamento ou tratamento de sementes com fungicidas melhoram a emergência em campo.

Carvalho e Camargo (2003) afirmam que o declínio na qualidade das sementes durante o armazenamento é expresso, inicialmente, como uma

diminuição na taxa de crescimento do eixo embrionário e, posteriormente, através da perda da capacidade de germinar. A queda no vigor, que culmina na inviabilidade da semente, é a manifestação mais comumente descrita na literatura como consequência da deterioração.

O eixo embrionário das sementes tem sido mais suscetível ao envelhecimento do que os cotilédones. Os aumentos na peroxidação de lipídios e acúmulo de hidroperóxidos foram observados por Fu *et al.* (1988) em embriões de sementes envelhecidas de amendoim (*Arachis hypogaea* L.); além disso, o teste de envelhecimento acelerado na condição de 45°C e 79% de umidade relativa, mostrou que o eixo embrionário foi mais susceptível a deterioração em relação aos cotilédones, inibindo a atividade das enzimas superóxido dismutante, peroxidase, ascorbato peroxidase e lipoxigenase, muito embora o acúmulo de peróxidos tenha sido detectado em ambas as partes (SUNG e JENG, 1994). Da mesma forma, os pontos de crescimento de eixos embrionários de sementes de soja (*Glycine max* L.) foram mais propensos ao envelhecimento acelerado, como foi determinado pelo teste de tetrazólio (CHAUHAN, 1985 e SENERATHA *et al.*, 1988).

Os mecanismos pelos quais as sementes perdem a viabilidade durante o armazenamento, ainda não estão devidamente esclarecidos, muito embora altas temperatura e umidade relativa do ar sejam descritas como os principais responsáveis pelos aumentos da velocidade de deterioração (SMITH e BERJAK, 1995).

Apesar de muitas mudanças em atividades enzimáticas e respiratórias, em vias de síntese, membranas, compostos armazenados e cromossomos, terem sido constatadas com a evolução do processo de envelhecimento de sementes, o local, as causas primárias, a natureza e as seqüências das reações químicas envolvidas nesses processos ainda permanecem em grande parte desconhecidas (GIL e DELOUCHE, 1973; BEWLEY, 1986).

Segundo Carvalho e Camargo (2003), a deterioração das sementes demonstra ser o resultado de um complexo conjunto de disfunções metabólicas e reações químicas, que atuam no sentido de alterar as funções específicas de cada constituinte celular. É interessante observar que mesmo sementes de espécies nada afins apresentam, muitas vezes, um padrão ou seqüências de alterações com alto grau de similaridade.

## 2.4 Conservação de Germoplasma Vegetal – Fundamentos e Definições

A maioria das culturas de sucesso é derivada e dependente dos seus ancestrais silvestres. Manter coleções de germoplasma é a maneira mais racional de prevenir contra eventos inesperados, como a ocorrência de novas pragas e doenças, ou a perda da resistência de determinadas culturas. A conservação da diversidade em bancos de germoplasma é um esforço pró-ativo que visa atender às demandas eventuais dos agricultores e assegurar a sustentabilidade econômica e ecológica da cultura (NÓBREGA *et al.*, 2001).

Segundo o International Board for Plant Genetic Resources – IBPGR (1991), germoplasma é o material que constitui a base física da herança e se transmite de uma geração a outra através de células reprodutivas. Em termos mais amplos pode ser considerado como o conjunto total dos materiais hereditários de uma espécie (ALLARD, 1960). No aspecto utilitário, o IBPGR (1991) adota o termo germoplasma para definir o indivíduo ou clone representativo de um tipo, espécie ou cultivar, que seja possível de ser mantido em um sistema de reposição. O United States National Plant Germplasm System (1991) emprega o termo germoplasma vegetal para designar cultivos, plantas, sementes ou outras partes da planta consideradas úteis para o melhoramento, a pesquisa e conservação, sempre com o propósito de estudar, manejar ou utilizar a informação genética que possuem. Goedert *et al.* (2002) complementa, conceituando o germoplasma como elemento dos recursos genéticos que maneja a variabilidade genética entre e dentro da espécie, com fins de utilização para a pesquisa em geral, especialmente, para o melhoramento genético, inclusive a biotecnologia.

A conservação de recursos genéticos implica na manutenção de coleções *in situ*, ou seja, nos seus locais de ocorrência, ou *ex situ* (VALOIS, 1998). Neste caso, 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 baixa concentração salina (conservação *in vitro*) ou criopreservadas (CGIAR, 1993).

A conservação *in situ* e *ex situ* do germoplasma de raças locais, cultivares domésticas e parentes silvestres de espécies agrônômicas, foi proposta como

medida de prevenção do processo de perda da variabilidade genética ou erosão genética que, segundo Faleiro (2004) significa a perda de genes ou combinações gênicas de plantas que possuem valor atual ou potencial para a agricultura. Entre as causas da erosão genética, pode-se citar a perda do *habitat* natural dessas plantas (desmatamento, desertificação, expansão urbana, modernização da agricultura), distúrbios do *habitat* (construção de rodovias e outras ações do homem), desastres naturais (secas, enchentes), substituição de variedades locais ou tradicionais por novas variedades melhoradas, mudanças nas práticas culturais, entre outros.

Embora o fenômeno da erosão genética possa ser irreversível, ações devem ser tomadas para prevenir ou minimizar as suas causas. Uma das ações é a conservação da variabilidade genética por meio de técnicas para conservação a longo prazo do germoplasma de espécies vegetais com a máxima integridade genética e biológica possível (BAJAJ, 1995; GONZÁLEZ-BENITO *et al.*, 2004). Segundo Paiva (1994), a conservação *ex situ* refere-se à manutenção de genes ou complexos de genes em condições artificiais, fora do seu *habitat* natural. Este tipo de conservação pode ser feito em coleções permanentes de pólen, sementes, cultura de tecidos e coleções de plantas mantidas em campo.

O banco de germoplasma é a denominação dada a uma estrutura onde se procura preservar as espécies vegetais, de maneira geral, na forma de células, tecidos, sementes, gemas ou plântulas *in vitro*, de modo a conservar os recursos fitogenéticos de uma região, país ou mundo. A importância dessa conservação dos recursos fitogenéticos é devida ao enorme valor estratégico que eles representam pois, a partir desse banco, é possível propiciar matéria-prima para se obter nova variedade e/ou melhoria das plantas, mediante melhoramento vegetal ou através da engenharia genética, além de constituir um instrumento de preservação do patrimônio genético de espécies ameaçadas de extinção (BERJAK *et al.*, 1990).

Segundo Vieira (2000), as coleções de germoplasma vem sendo mantidas em instituições diversas que têm, por responsabilidade: garantir a sua diversidade genética, seja pela iniciativa de coletar periodicamente recursos genéticos, ou por favorecer o intercâmbio com outros bancos de germoplasma, multiplicá-las, distribuí-las aos usuários e promover a sua caracterização por diferentes

metodologias. Essas coleções são ditas ativas. Uma segunda forma de conservação é aquela que propõe manter as coleções por períodos longos, sem que se utilizem delas para estudo, cessão, intercâmbio, entre outros.; neste caso, são denominadas coleções de base – Colbase (PISTORIUS, 1997; SACKVILLE e CHORLTON, 1997).

Toda amostra de germoplasma que representa a variação genética de uma população ou de um indivíduo propagado clonalmente é denominada de acesso. Segundo Morales *et al.* (1997), deve-se preferir o termo acesso ou seus equivalentes “*accesión*” em espanhol ou “*accession*” em inglês, ou ainda tem quem se refira como entrada, por representar um elemento da coleção, e coleta, para indicar que trata-se de amostra obtida mediante procedimentos de coleta. Na prática, todo acesso propagado adequadamente, reproduz as características genéticas da população de onde foi obtida.

A semente é a unidade de propagação natural para a maioria das espécies de plantas superiores, sendo por isso, a forma mais comum de conservação *ex situ*. A metodologia convencional para conservação de germoplasma de semente compreende a desidratação, para teores de umidade extremamente baixos (5%), e armazenamento em câmaras a temperaturas que variam de 0 a 10°C e umidade relativa entre 20 e 40%, podendo existir, em muitos casos, sementes que são conservadas em temperaturas abaixo de zero, -18 a -20°C (Roberts, 1973b).

O poder germinativo e o teor de umidade das sementes de cada acesso em uma coleção ativa, que utiliza seu acervo para multiplicação, caracterização e distribuição, precisam ser monitorados de maneira ordenada e eficiente durante o período de conservação, para a manutenção da qualidade das sementes. Conforme Vencovsky (1986), quando a queda da viabilidade das sementes supera os 50%, a representatividade genética das amostras diminui ao limite em que é impraticável recuperar as características genéticas da amostra inicial. Além disso, as condições ideais para a conservação à longo prazo de germoplasma-semente são igualmente ideais para a conservação de patógenos a eles associados. O monitoramento das qualidades fisiológica e sanitária dos produtos que compõem a Colbase é de fundamental importância. Por meio do monitoramento têm sido identificados quais acessos devem ser regenerados e/ou multiplicados, assim como quais patógenos associados às sementes estão

contribuindo para a deterioração ou perda da viabilidade dos acessos (FAIAD *et al.*, 2004).

Sementes de numerosas espécies de plantas toleram a desidratação e manutenção em baixas temperaturas, apresentando alta viabilidade após o armazenamento nessas condições, sendo assim classificadas como ortodoxas (ROBERTS, 1973b); entretanto, existem sementes muito sensíveis (recalcitrantes) ou moderadamente sensíveis (intermediárias) à desidratação e ao congelamento, que não sobrevivem ao armazenamento nessas condições (ROBERTS, 1973b; ELLIS *et al.*, 1990; ELLIS *et al.*, 1991). Este é o caso de sementes de inúmeras espécies aquáticas, plantas arbóreas e arbustivas de importância econômica, nativas de regiões tropicais e subtropicais, tais como: dendê (*Elaeis oleifera* [Kunth.] Cortes), côco (*Cocos nucifera* L.), borracha (*Hevea brasiliensis* M. Arg.), cacau (*Theobroma cacao* L.), café (*Coffea* spp.) e citros (*Citrus* spp.). Sob baixa temperatura e relativa umidade, sua viabilidade pode manter-se por poucas semanas ou até por alguns meses, o que representa muito pouco em termos de conservação. Usualmente, essas espécies são conservadas *ex situ*, isto é, a campo, o que é extremamente caro e laborioso. Da mesma maneira, populações com elevada heterozigidade, coleções de plantas com períodos juvenis muito longos ou cujas sementes são produzidas em pouca quantidade, com viabilidade reduzida ou quando essa se mantém por pouco tempo, são mantidas, vegetativamente, a campo ou em casa de vegetação (VIEIRA, 2000). Existem, ainda, espécies que se propagam exclusivamente de forma vegetativa, como a batata-doce (*Ipomea batatas* (L.) Lam), batata-inglesa (*Solanum tuberosum* L.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) ou que não produzem sementes viáveis como a banana (*Musa* spp.), para as quais não existem uma metodologia de conservação a longo prazo.

No entanto, Berjak *et al.* (2000) alertam que a manutenção de material vegetal a campo não é a melhor opção para a conservação de recursos genéticos, porque plantas nessas condições estão permanentemente expostas a desastres climáticos e biológicos, os quais podem levar à perda total da coleção de germoplasma. Para superar essas dificuldades, estudos na área biotecnológica têm sido intensificados, sendo a criopreservação, a única técnica disponível com potencial para garantir a conservação a longo prazo do germoplasma de espécies problemáticas, sanar a desvantagem econômica dos

bancos de germoplasma convencionais e evitar a erosão genética das espécies vegetais, consistindo na manutenção do material vegetal em vapor de nitrogênio (-170°C) ou em nitrogênio líquido (-196°C). Esta técnica, segundo Pita Villamil (1997), permitiria no caso das sementes, que a sua deterioração fosse impedida, pois de acordo com o mesmo autor, nestas condições o metabolismo é paralisado; com o que se assegura, em teoria, sua conservação indefinidamente (STANWOOD, 1984 e STANWOOD, 1985). Contudo, a influência de numerosos fatores deve ser avaliada antes de poder utilizar a criopreservação: conteúdo de umidade das sementes, tamanho, anatomia e as velocidades de resfriamento ou congelamento e reaquecimento ou descongelamento (STANWOOD e BASS, 1981; VERTUCCI, 1989).

Nos últimos anos, a conservação *in vitro*, que envolve manutenção de culturas em crescimento ativo através de subculturas periódicas de brotos e segmentos nodais, vem sendo aplicada com sucesso em inúmeras espécies de importância econômica, como: café (*Coffea arabica* L.), morango (*Fragaria* spp.), banana (*Musa* spp.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.), batata (*Solanum* spp.), batata-doce (*Ipomea batatas*), videira (*Vitis* spp.) e maracujá (*Passiflora* spp.) (DODDS, 1991; BAJAJ, 1995; VIEIRA, 2000). Segundo Giacometti e Goes (1986) a instalação de bancos de germoplasmas *in vitro* consiste, basicamente, em introduzirem explantes de plantas adultas em meio de cultura estéril e mantê-los em condições livres de patógenos, para uso futuro; entretanto, esta técnica permite conservar o germoplasma vegetal somente por curtos períodos de tempo, nove a doze meses, dependendo do procedimento ou da espécie vegetal tornando-se, desta forma, uma prática dispendiosa, principalmente quando se mantêm coleções em locais distintos. Dessa forma a afirmativa de Vieira (2000), onde informa que os sistemas de conservação *in vitro* não eliminam a importância de manter clones *in vivo*; são coleções que complementam-se e ambas podem constituir-se em bancos ativos. Portanto, nenhuma das diferentes metodologias existentes e em prática, no momento, para conservação do germoplasma vegetal, permite conservar, a longo prazo, espécies que são propagadas vegetativamente ou que produzem sementes recalcitrantes ou intermediárias, com alta estabilidade genética e biológica (STUSHNOFF e SEUFFERHELD, 1995).

No manejo de germoplasma Ford-Lloyd e Jackson (1986) e Morales *et al.* (1997) afirmam que uma das principais preocupações é diminuir ou evitar



alterações na estrutura genética dos acessos, principalmente, nas seguintes situações: 1) Seleção natural: ocorre pelo aumento da proporção de certos genótipos, ao longo de sucessivas gerações em detrimento de outras, provocada por fatores bióticos e abióticos. O efeito da seleção natural pode ocorrer através de alterações ou mudanças na estrutura genética dos acessos de germoplasma, provocada pela perda de alelos ou pela alteração da frequência de alelos adaptáveis (RUSSEL, 1988). Pode ocorrer de forma acentuada durante os procedimentos de multiplicação inicial ou de regeneração do germoplasma, principalmente, quando são realizados em ambientes diferentes a aqueles de onde foram obtidos os acessos. Para evitar ou diminuir o efeito da seleção natural durante a regeneração, uma das causas mais importantes de descaracterização dos acessos, é prudente tomar precauções adequadas. No caso de sementes que estão em conservação, Breese (1989) recomenda proceder a regeneração antes que o poder germinativo baixe de 85% em relação ao inicial. 2) Migração: que provoca uma alteração na frequência alélica de uma população pela incorporação de alelos de outras populações (RAMALHO *et al.*, 1990). Esta situação pode ocorrer durante os procedimentos de multiplicação inicial ou de regeneração dos acessos, quando os procedimentos são realizados sem levar em consideração o sistema reprodutivo do acesso. 3) Mutação: que consiste na súbita alteração do material responsável pela herança, devido a modificações no material genético (IBPGR, 1991). Esse tipo de alteração pode ocorrer durante o manejo do germoplasma, principalmente naqueles procedimentos relacionados com a conservação do germoplasma por criopreservação ou conservação *in vitro*. Razão pela qual, durante o planejamento de um sistema de conservação do germoplasma, é importante levar em consideração que mesmo ocorrendo mutações em níveis relativamente baixos, essa alteração ocorre continuamente na natureza, podendo inclusive afetar o germoplasma mantido à longo prazo em câmaras frigoríficas.

Paiva (1994), afirma que em alguns programas de melhoramento de espécies cultivadas, vêm sendo processando, gradativamente, e que a perda de variabilidade genética, devido, principalmente, ao pouco interesse em conservar material que não apresente características desejáveis, no atual estágio de desenvolvimento das técnicas de melhoramento inerente a cada espécie. No presente material vegetal considerado de pouca importância para os melhoristas,

poderá, no entanto, ser de grande utilidade no futuro. Assim é que novas fontes de genes são procuradas na natureza, visando introduzir maior variabilidade genética nos programas de melhoramento.

## **2.5 Criopreservação de Germoplasma Vegetal – Princípios e Metodologias**

Segundo Sakai (1997), para a conservação a longo prazo, a disponibilidade e desenvolvimento de técnicas seguras e de custo efetivo, com subsequente elevada regeneração de plantas são os requerimentos básicos. Na última década, alguns procedimentos criogênicos simplificados e confiáveis como a vitrificação, encapsulamento-dessecação e encapsulamento-vitrificação têm sido desenvolvidos e aumentado o número de espécies ou cultivares criopreservadas.

A maioria das sementes tolerantes à desidratação (ou dessecação) sobrevive a tratamentos criogênicos, isto é, a temperaturas abaixo de  $-130^{\circ}\text{C}$ . A esta temperatura, os únicos estados físicos existentes 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 (KARTHA, 1985). Portanto, a temperatura do nitrogênio líquido a viabilidade durante o armazenamento pode ser estendida por muitos anos e alta estabilidade genética pode ser mantida (STUSHNOFFE e SEUFFERHELD, 1995).

Assim, a criopreservação é uma técnica que permite manter o germoplasma durante vários anos (*long term storage*) sob temperatura ultra-reduzida, em geral  $-196^{\circ}\text{C}$ . Nessa temperatura, os riscos de perda do material biológico são menores e os custos mais baixos em relação a outros métodos (BAJAJ, 1978; BAJAJ, 1985; HANDING e BENSON, 1994). Podem ser criopreservados ápices e gemas, embriões somáticos e zigóticos, células em suspensão e até protoplastos, ou seja, células desprovidas da parede celular. A priori, é preciso otimizar protocolos visando garantir a regeneração de plantas inteiras a partir das estruturas criopreservadas (SAKAI, 1995; STUSHNOFF e SEUFFERHELD, 1995; YONGJIE *et al.*, 1997).

Sucessos na criopreservação de um considerável número de espécies têm sido relatados (URAGAMI, 1993; WITHERS e ENGELMAN, 1998) e vários

protocolos propostos, mas, todos os procedimentos de criopreservação apresentam uma etapa em comum, que é a de preparar a estrutura vegetal a ser conservada para a imersão em nitrogênio líquido. O estabelecimento de protocolos para a criopreservação de sementes está condicionado ao conhecimento de suas propriedades físicas e químicas e da determinação do conteúdo de umidade ideal, bem como das taxas apropriadas de congelamento e descongelamento, para evitar a formação de cristais de gelo no interior da célula, o que é fatal (STANWOOD e ROOS, 1979; ENGELMANN, 2000). Tais fatores são específicos e requerem estudos e avaliações para cada espécie (DICKIE e SMITH, 1995; POTTS e LUMPKIN, 1997).

### **2.5.1 Descongelamento Lento**

Segundo Santos (2000), os primeiros protocolos de criopreservação de tecidos vegetais eram baseados no congelamento lento. Este processo envolve o congelamento lento até uma temperatura previamente definida (temperatura de pré-congelamento, por volta de  $-40^{\circ}\text{C}$ ) a uma velocidade de congelamento controlada ( $1$  a  $10^{\circ}\text{C.hora}^{-1}$ ), usando um congelador programável, seguido de imersão direta em nitrogênio líquido (ENGELMANN, 1997). Este método foi baseado nos eventos físico-químicos que ocorrem durante o processo de congelamento, que levam à desidratação celular induzida pelo congelamento, os quais foram descritos por Mazur (1963) e Mazur (1969). Em tais casos, a célula se desidrata, reduzindo a um mínimo ou removendo completamente a água livre, evitando a formação de gelo em seu interior. Após o descongelamento, as células intactas podem reabsorver água e ganhar turgor novamente (SAKAI e LARCHER, 1987).

Alguns cuidados devem ser levados em consideração no método convencional de congelamento lento, pois se a célula for congelada muito rapidamente, a desidratação por congelamento não ocorrerá, as células se tornarão cada vez mais super-resfriadas e eventualmente, a solução intracelular, que contém alto teor de água livre, congelará, formando cristais de gelo que causam injúrias mecânicas às células (STEPONKUS e WEBB, 1992; FIND *et al.*, 1998); entretanto, quando as células são desidratadas em excesso, elas podem

ser danificadas pela exposição aos efeitos nocivos da concentração elevada dos eletrólitos celulares. Em resumo, o método de congelamento lento é um procedimento complexo no qual a velocidade de congelamento e a temperatura de pré-congelamento exerce papel crítico na preservação da viabilidade do material (SANTOS, 2000). Além disso, alguns autores afirmam que tal procedimento produz baixas taxas de formação de brotos e recuperação do crescimento, dando lugar ao desenvolvimento de calos (TOWILL 1983; TOWILL, 1984; BENSON *et al.*, 1989).

### **2.5.2 Vitrificação**

As técnicas de criopreservação desenvolvidas mais recentemente, se baseiam na vitrificação. Vitrificação ou formação do estado vítreo, é o processo através do qual a água sofre uma transição da fase líquida para o estado sólido amorfo e meta-estável (FAHY *et al.*, 1984; FRANKS, 1982).

A vitrificação do citoplasma é obtida, experimentalmente, por meio da desidratação dos tecidos para um teor de umidade em que não existe água livre para a cristalização, antes de mergulhá-lo em nitrogênio líquido; assim, a solução celular torna-se muito concentrada e pode passar pela transição de vitrificação quando a velocidade de congelamento apropriada for utilizada evitando, desse modo, a formação de gelo durante a exposição em temperaturas subzero.

Vieira (2000) enfatiza que a desidratação pode ser obtida por evaporação da água ou por tratamento com uma solução altamente concentrada de crioprotetores químicos (solução de vitrificação) como o dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, glicerol, etileno glicol, propileno glicol, dentre outros. Primeiro, utilizam-se soluções com baixas concentrações para que haja entrada dos componentes permeáveis na célula e, em seguida, soluções concentradas de crioprotetores, para promover a vitrificação, para só então se transferir os frascos para o nitrogênio líquido; entretanto, esses crioprotetores podem causar citotoxicidade e estresse osmótico, levando à morte das células ou modificando sua resposta morfogenética em cultura (KARTHA, 1985; SAKAI, 1995). Mais recentemente, açúcares, como a sacarose, trealose e glucose, têm sido utilizados como substâncias crioprotetoras, porque elas são excelentes agentes vitrificadores e, além disto, não apresentam toxicidade para as células vegetais, nem mesmo

quando se acumulam em grande quantidade, no citoplasma (WITHERS, 1991; YAMADA, 1993; DUMET *et al.*, 1994). 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) porém, 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 também não foi demonstrada.

Em algumas situações, a imersão em nitrogênio líquido pode ser direta, desde que os ápices caulinares sejam pré-tratados em solução osmótica de concentração moderada, uma vez que a desidratação é necessária, antes de haver a vitrificação. Alternativamente, em uma estratégia relativamente nova, usa-se a desidratação celular pelo choque osmótico, com soluções muito concentradas e, depois, elas são mergulhadas diretamente dentro do nitrogênio líquido induzindo a vitrificação da suspensão celular eliminando, deste modo, a necessidade de se usar congeladores programáveis (SAKAI *et al.*, 1991 e WANG *et al.*, 1998). Este método de vitrificação requer, usualmente, um período de pré-cultura em seqüência, promovendo o endurecimento das células para resistir ao choque osmótico e alcançar altas taxas de sobrevivência, após congelamento; no entanto, o uso de aditivos osmoticamente ativos no meio de pré-cultura, é muito comum, as respostas para isto são variáveis entre espécies e os processos fisiológicos na relação para o endurecimento da célula, não têm sido ainda investigado inteiramente.

### **2.5.3 Encapsulamento-dessecação**

Como alternativa à desidratação celular induzida pelo congelamento antes da imersão em nitrogênio líquido, Dereuddre *et al.* (1990) propuseram o processo de encapsulamento-dessecação, que se baseia na tecnologia desenvolvida para a produção de sementes artificiais, sendo possível, então, criopreservar ápices ou embriões somáticos encapsulados em alginato de sódio (3 a 5 mm), as quais são pré-cultivadas em um meio contendo altos níveis de sacarose (0,5 a 0,7 M) sob agitação, *overnight* (etapa de desidratação), desidratadas por exposição ao ar da câmara de fluxo laminar ou com sílica gel, colocadas em ampolas, imersos

diretamente em nitrogênio líquido e lentamente descongelados. Há registros de coleções de gemas apicais e brotos encapsulados de pereira (*Pirus spp.*) (SCOTTEZ *et al.*, 1992), batata-inglesa (*Solanum tuberosum* L.) (FABRE e DEREUDDRE, 1990), videira (*Vitis spp.*) (PLESSIS *et al.*, 1993) e embriões somáticos de cenoura (*Daucus carota* L.) (DEREUDDRE *et al.*, 1991).

Encapsulamento-dessecação 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 congeladores programáveis, sobrevivência independente 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).

## **2.6 Fatores que Afetam a Sobrevivência à Criopreservação**

O grande desafio para o criobiologista é realizar um congelamento sem a formação de cristais de gelo no interior das células. A formação de gelo no meio intracelular causa ruptura do sistema de membranas celulares, resultando em perda da semipermeabilidade e da compartimentação celular e, como conseqüência, as células entram em colapso e morrem (SANTOS, 2001).

Segundo Engelmann *et al.* (1997), a sobrevivência e a regeneração de material criopreservado dependem 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 juvenil em estágio meristemático, é mais apropriado porque suas células são pequenas e contêm citoplasma denso com poucos vacúolos contendo pouca água (ENGELMANN, 1991). Amostras podem ser coletadas de plantas produzidas *in vivo* ou *in vitro*, contudo, material produzido *in vitro* tem preferência

em muitos casos porque os explantes já estão em condição asséptica e podem estar, também, livres de patógenos.

Segundo Toribio e Celestino (2000) mais de quarenta gêneros e sessenta espécies de plantas lenhosas têm sido objeto, nos últimos dez anos, de intensos estudos para se obter protocolos viáveis de criopreservação. O passo mais crítico para obter um protocolo viável é reduzir o conteúdo de umidade do material a conservar e/ou evitar a formação de cristais de gelo. Em geral, as sementes, os embriões e os eixos embrionários se criopreservam prévio a desidratação por ar, os ápices e meristemas são submetidos a um processo de vitrificação ou encapsulamento-desidratação, os calos e cultivos em suspensão se tratam com um processo em dois passos ou vitrificação. Stushnoff e Seufferheld (1995) esclarecem que a capacidade de tecidos vegetais sobreviverem à criopreservação depende da sua tolerância à desidratação e à temperatura do nitrogênio líquido. Por isso, o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação requer conhecimentos de mecanismos bioquímicos e biofísicos associados com a resposta dos tecidos à desidratação e ao congelamento.

### **2.6.1 Desidratação**

As injúrias mecânicas sofrida pelas células durante a criopreservação advém de dois fenômenos: o comportamento peculiar da água, que se expande ao congelar-se, e a conformação dos cristais de gelo (VERTUCCI e FERRANT, 1995). Entretanto, evitar a formação desses cristais não é uma tarefa fácil, porque 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, necessitando, portanto, que a água seja removida. Entretanto, a desidratação que, a princípio, parece uma solução simples, é uma etapa crítica, uma vez que a água tem muitas funções biológicas nas células de organismos vivos, por ser um importante solvente, meio de transporte, resfriador (através da evaporação), um constituinte essencial e estabilizador da estrutura das macromoléculas e organelas (KRAMER e BOYER, 1995; VERTUCCI e FARRANT, 1995). Quando a água é removida das células, os solutos tornam-se 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 e BOYER, 1995). Portanto, o sucesso de um protocolo de criopreservação depende da desidratação para um teor de água que seja baixo, o suficiente, para evitar a formação de gelo intracelular, mas não tão reduzido que cause injúria por desidratação.

### **2.6.2 Congelamento**

As injúrias causadas pelo congelamento são complexas, podendo ocorrer devido á desidratação excessiva ou à formação de gelo dentro das células. Nesses casos ocorrerá rompimento das membranas, concentração de solutos no citoplasma a níveis tóxicos e desnaturação de ácidos nucléicos e membranas. Formação de gelo e as injúrias a ele associadas ocorrem de modo diferente dependendo da espécie vegetal, 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 e LARCHER, 1987). Entretanto, parece ser um consenso geral que, injúria decorrente de congelamento é primariamente uma conseqüência 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 por ser 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 e 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 conseqüência da estabilidade da membrana plasmática.



### **2.6.3 Descongelamento**

Semelhante ao que ocorre no congelamento, durante o descongelamento, também, poderá ocorrer formação de cristais de gelo e, em conseqüência, as células podem ser danificadas pelos mesmos mecanismos já discutidos anteriormente. Segundo Santos (2000), o 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 de-vitrificação.

Há controvérsias quanto à velocidade de congelamento e descongelamento adequada para garantir a integridade do material quando exposto ao nitrogênio líquido. Stanwood e Bass (1981) sugerem que o congelamento rápido tende a promover um resfriamento mais uniforme de água subcelular e o descongelamento lento evita danos nos tecidos e células das sementes. Em contraste, Dumet e Benson (2000) propõem que o congelamento rápido resulta em formação de cristais de gelo intracelulares, o que é letal para as células e os tecidos das sementes. Por outro lado, o congelamento lento resulta em danos ou morte celular, porque ocorre uma desidratação osmótica extrema, quando a água intracelular movimenta-se para fora da célula compensando a água congelada dos componentes extracelulares.

### **2.6.4 Regeneração**

Para garantir o sucesso do protocolo de crioproteção, é necessário que o processo de regeneração propicie a recuperação da maior quantidade de células vivas e que induza a formação de uma nova planta. Withers (1980) reforça afirmando que a cultura de tecidos de plantas *in vitro* pode contribuir em todas as etapas do processo de conservação de germoplasma, incluindo coleta, indexação para doenças, quarentena, multiplicação, caracterização, avaliação, armazenamento e distribuição.

A cultura de tecidos tem se tornado importante para o manejo das plantas cultivadas, principalmente na limpeza clonal e multiplicação de espécies herbáceas e arbustivas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990). O método é aplicado na produção massal, economizando tempo e espaço; e, obtenção de indivíduos com características genéticas idênticas à matriz ou favorecendo a

variabilidade genética (OLIVEIRA *et al.*, 1991). Avanços mais recentes incluem sua aplicação em espécies recalcitrantes (MOLINA e SCHOBERT, 1996) e medição do crescimento rítmico com base na época de excisão e posição da gema (EL-MORSY e MILLET, 1996).

Métodos de avaliação por coloração tais como teste de tetrazólio e de diacetato de fluorescência têm sido usados para avaliar a viabilidade de sementes, 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.

## **2.7 Criopreservação de Espécies Vegetais**

O material mais apropriado para criopreservar é o de espécies que se propagam vegetativamente, podendo interessar a conservação de clones específicos com características de interesse. No caso de genótipos de álamo branco (*Populus Alba* L.), em que se desenvolveu um protocolo de criopreservação de gemas axilares utilizando a técnica de vitrificação, alcançou porcentagens de sobrevivência de 90% (CACCAVALE *et al.*, 1998). No entanto, Reed *et al.* (1998) de posse de diferentes genótipos de pêra (*Pyrus* L.), submeteram seus ápices a criopreservação através do método do congelamento lento ( $0,1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  até  $-40^{\circ}\text{C}$ ) associado ao pré-tratamento com os crioprotetores DMSO a 5% por 48 horas e 1 mL de PGD (10% de polietileno glicol + 10% de glicose + 10% de DMSO), adicionado gradualmente em 30 minutos no interior de criotubos de 1-2 mL contendo 0,25 mL de meio líquido e então submetidos ao

nitrogênio líquido, alcançando, após descongelamento, boa recuperação (>40%) em 61% dos genótipos avaliados.

Nem sempre a taxa e sobrevivência de explantes criopreservados coincide com sua capacidade de garantir regeneração. Vandebussche *et al.* (2000), empregando ápices de beterraba (*Beta vulgaris* L.), utilizaram-se do protocolo de vitrificação para criopreservação daqueles explantes, os quais foram pré-cultivados por 24 horas em meio com 0,3 M de sacarose (5°C) e em seguida mergulhados por 20 minutos em uma solução mista de 2 M de glicerol e 0,4 M de sacarose (20°C) e desidratados com PVS2 (0°C) por 20 minutos, prévio a imersão em nitrogênio líquido, obtendo taxas de sobrevivência na ordem de 60 a 100% dependendo do clone empregado, no entanto, apenas 10 a 50% dos ápices conseguiram dar prosseguimento à regeneração. Já Devallée *et al.* (1989) criopreservando embriões imaturos de milho após tratamento com DMSO (5 e 10%) e/ou glicerol (5%) durante 15 minutos ou 1 hora, empregando o congelamento lento, não obtiveram regeneração após descongelamento em banho com água a 40°C ou pela secagem em ar à 45°C por aproximadamente 1 minuto.

Na vitrificação, o crioprotetor empregado, isolado ou associado, assim como sua concentração, dependendo do explante empregado, pode influenciar na capacidade de regeneração após criopreservação. Uemura e Sakai (1980) avaliando a criopreservação de ápices de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.), empregando o método da vitrificação com diferentes agentes crioprotetores, obtiveram elevada capacidade de regeneração, quando o DMSO foi empregado isolado ou associado com 5% de glicose, sacarose ou sorbitol. Kartha *et al.* (1979) avaliaram a criopreservação de meristemas de ervilha (*Pisum sativum* L.), através do seu pré-cultivo na presença de 5% de DMSO por 48 horas, obtendo elevada sobrevivência (70%) quando submetidos a uma taxa de congelamento de 0,6°C.min<sup>-1</sup>, após 1 hora em nitrogênio líquido.

Em estudos desenvolvidos por González-Benito *et al.* (1999) na obtenção de protocolos para espécies com sementes recalcitrantes, como é o caso do *Quercus* spp., buscou-se recuperar o crescimento de eixos embrionários de *Q. suber* e *Q. ilex* encapsulados em gotas de alginato. Na espécie tropical mutamba (*Guazuma critina* Mart.) obteve-se recuperação através da imersão em nitrogênio líquido de explantes consistentes em agrupamentos de gemas adventícias,

mediante tratamento prévio de encapsulamento-vitrificação (MARUYAMA *et al.*, 1998).

Apesar do encapsulamento apresentar diversas vantagens quando comparado a outros métodos de criopreservação, o seu emprego pode provocar reduções e/ou atrasos na emissão das estruturas do explante. Hansan e Takagi (1995) encapsularam segmentos nodais (3-4mm) de inhame (*Dioscorea spp.*) com alginato de sódio com diferentes concentrações de sacarose, verificando que a porcentagem de emissão de brotos, pelos explantes, foi retardada quando as bolhas continham concentrações superiores a 0,3 M de sacarose. González-Benito e Perez (1997) relataram que, durante o cultivo *in vitro*, a remoção dos explantes das bolhas de alginato podem favorecer o seu melhor desenvolvimento, apesar de afirmarem que a concentração de sacarose não exerce nenhuma influência na sobrevivência ou viabilidade de nós encapsulados de *Centaureum rigualli*.

O conteúdo de água dos explantes encapsulados é outro fator limitante na criopreservação. Eixos embrionários de citros (*Citrus sinensis* L.; *Citrus limon* L. e *Citrus reticulata* Blanco) foram criopreservados por Santos e Stushnoff (2002), empregando um protocolo de encapsulamento-dessecação, com o qual alcançaram 70% de regeneração, após imersão em nitrogênio líquido, quando continham 0,15 g H<sub>2</sub>O.g<sup>-1</sup> de massa seca. Tanoury *et al.* (1995) criopreservando ápices de *Dianthus caryophyllus* L., pelo encapsulamento em alginato de sódio, após pré-cultivo em meio enriquecido com sacarose (0,75 a 1M), obtiveram elevada sobrevivência quando dessecados por 4 horas, para atingir 20% do conteúdo de água, prévio ao congelamento.

González-Benito e Perez (1997) criopreservaram explantes nodais de *Centaureum rigualli*, usando o método de encapsulamento-dessecação, pré-cultivando os explantes por 24 horas em meio contendo 0,3 M de sacarose e, após encapsulamento, cultivados por 19 horas em meio com 0,75 M de sacarose e então dessecados com sílica gel por 4 horas com subsequente imersão por 1 hora no nitrogênio líquido, apresentando sobrevivência de 70% após descongelamento rápido pela imersão em água a 40°C por aproximadamente 1 minuto.

Avaliando a dessecação e criopreservação na germinação de sementes de diferentes cultivares de algodoeiro, González-Benito *et al.* (1998), verificaram que

a germinação não foi afetada por nenhum dos tratamentos nas cultivares CNPA 5M e CNPA Precoce 1 e Coker 312; contudo, a viabilidade das sementes das cultivares CNPA 5M e CNPA Precoce 2 foi reduzida quando dessecadas e o teor de umidade baixou de 9,8 e 15,6% para 2,8 e 3%, respectivamente. Rocha (2004) avaliando o teor de água limite para a criopreservação de sementes de algodoeiro das cultivares BRS Verde, BRS 200, 6M Mocó e BRS 187-8H, concluiu estar entre 6 e 8% com base no peso fresco.

Almeida *et al.* (2002) avaliaram a criopreservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana, afirmando estar entre 4 a 10% o nível máximo de umidade para criopreservação e que, nesta faixa de umidade, as sementes de mamona podem ser mantidas tanto no vapor (-176°C) como na imersão (-196°C) em nitrogênio líquido, sem afetar sua viabilidade.

Vários protocolos de criopreservação foram desenvolvidos para embriões zigóticos de um grande número de espécies, dentre as quais muitas são sementes recalcitrantes armazenadas. Isto não é o caso dos embriões somáticos, para os quais apenas um limitado número de estudos foram realizados até agora. Pesquisas realizadas na criopreservação de embriões abrangem na maior parte aspectos metodológicos e apenas uma limitada quantidade de trabalhos com o conhecimento dos mecanismos biológicos em relação à criopreservação. Vários métodos são empregados para o congelamento de embriões (ENGELMANN, 1991). Protocolos clássicos, incluindo pré-cultivo com crioprotetores e resfriamento lento, e encapsulamento-desidratação (DEREUDRE *et al.*, 1991) são usadas para embriões somáticos. A maior parte dos embriões somáticos são congelados rapidamente após dessecação parcial. Finalmente, uma nova técnica de dessecação chamada secagem rápida foi desenvolvida com embriões zigóticos de *Landolphia kirkii* (BERJACK *et al.*, 1990). A secagem rápida é seguida pelo congelamento em taxas intermediárias (VERTUCCI *et al.*, 1991) ou ultra-rápida (WESLEY-SMITHE *et al.*, 1992).

Na atualidade, a criopreservação de eixos embrionários pode ser a metodologia mais apropriada para a conservação à longo prazo da diversidade genética das espécies vegetais, uma vez que os eixos podem resistir a condições que seriam letais para a semente inteira (BERJACK *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2002). Segundo Faiad *et al.* (2004) eixos embrionários podem tolerar teores de umidade por volta de 12% e subsequente congelamento em nitrogênio líquido e

ser resgatados, após criopreservação, usando a cultura de tecidos, sendo que deles se originam plantas inteiras.

González-Rio *et al.* (1994) avaliando a dessecação e criopreservação de embriões de oliva (*Oliva europaea* L.), alcançaram elevada porcentagem de germinação (70%), regenerando plantas morfológicamente uniformes, quando dessecados para um teor de água de 3-10% prévio à imersão no nitrogênio líquido.

Eixos embrionários de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) foram bem sucedidamente criopreservados por Rhuntala *et al.* (1993), após dessecação para teor de água de 7% e tratamento com glicerol a 10%, empregando uma taxa de resfriamento de  $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  até uma temperatura de pré-congelamento de  $-40^{\circ}\text{C}$ , garantindo elevada sobrevivência, após descongelamento rápido por meio da imersão em água à  $38-40^{\circ}\text{C}$  por 1 min.

González-Benito *et al.* (1998) afirmam que eixos embrionários de algodoeiro da cultivares CNPA Precoce 2 e Coker 312 resistiram a criopreservação quando dessecados por período superior a 30 minutos em sílica gel e alcançarem teor de água igual ou menor do que 19,4%.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-BAKI, A.A.; ANDERSON, J.D. Physiological and biochemical deterioration of seeds. In: KOSLOWSKI, T.T. (ed.). **Seed biology**, New York: Academic Press, 1972. v.2, p.283-315.

ALLARD, R.W. **Principles of plant breeding**, New York: John Wiley, 1960.

ALMEIDA, F. de A.C.; MORAIS, A.M.; CARVALHO, J.M.F.C.; GOUVEIA, J.P.G. de. Crioconservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.6, n.2, p.295-302, 2002.

ALMEIDA, F. de A.C.; PITA VILLAMIL, J.M.; GOUVEIA, J.P.G.. Efeito de la crioconservacion sobre la germinacion de semillas de leguminosas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.2, n.1, p.67-71, 2000.

ANJANI, K.; DUHOON, S.S.; YADAV, W.S. Collecting castor (*Ricinus communis* L.) germplasm in northwestern India. **Plant Genetic Resources Newsletter**. n.120, p.48-51, 1999.

ARAÚJO, A.E.; SILVA, C.A.D.; FREIRE, E.C.; COSTA, J.N.; AMARAL, J.A.B.; MEDEIROS, J.C.; SILVA, K.L.; BARROS, M.A.L.; BELTRÃO, N.E.M.; SUASSUNA, N.D.; FIRMINO, P.F.; ALMEIDA, R.P.; SANTOS, R.F.; FREIRE, R.M.M.; PEREIRA, S.R.P. Sistemas de Produção. **Cultura do algodão herbáceo na agricultura família**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, v.1, 2003.

Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML>>

Acesso em: 13 de janeiro 2005.

ASHMORE, S.E. **Status report on the development and application of in vitro techniques for the conservation and use of plant genetic resources**. IPGRI. International Plant Genetic Resources Institute, Roma, Italia, 1997.

AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: EMBRAPA-SCT, 2001. 350p.

- BACHIRI, Y.; GAZEAU, C.; HANSZ, F.; 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 germplasm of potato (*Solanum tuberosum* L.) and cassava (*Manihot esculenta* Crantz): viability of excised meristems criopreserved up to four years. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.23, p.285-287, 1985.
- BAJAJ, Y.P.S. Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry: Cryopreservation of plant germplasm I**. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, v.32, p.3-28, 1995.
- BAJAJ, Y.P.S. Tuberization in potato plants regenerated from freeze-preserved meristems. **Crop improvement**, v.5, p.137-141, 1978.
- BASRA, A.S. **Seed Quality: Basic Mechanisms and Agricultural Implications**. Food Products Press, 1994, 389p.
- BELTRÃO, N.E.M. **Breve história do algodão no Nordeste do Brasil**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 2003. 17p. (EMBRAPA-CNPA: Documentos, 117).
- BELTRÃO, N.E.M. **O agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília: EMBRAPA-CTT, v.1, 1999. 491p.
- BELTRÃO, N.E.M.; MELO, F.B.; CARDOSO, G.D.; SEVERINO, L.S. **Mamona: árvore do conhecimento e sistemas de produção para o semi-árido brasileiro**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 2003. 19p. (EMBRAPA-CNPA. Circular Técnica, 70).
- BELTRÃO, N.E.M.; SILVA, L.C.; VASCONCELOS, O.L.; AZEVEDO, D.M.P.; VIEIRA, D.J. Fitologia. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: EMBRAPA-SCT, 2001, p.37-61.
- BELTRÃO, N.E.M.; SOUZA, J.G. Fitologia do algodão herbáceo: sistemática, organografia e anatomia. In: BELTRÃO, N.E.M. **O agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília: EMBRAPA-CTT, v.1, 1999, p.56-86.



BENSON, E.E.; HANDING, K.; SMITH, H. Variation in recovery of cryopreserved shoot-tips of *Solanum tuberosum* exposed to different pre- and post-freeze light regimes. **Cryo-Letters**, Cambridge, v.10, p.323-344, 1989.

BERJAK, P.; FARRANT, J.M.; MYCOCK, D.J.; PAMMENTER, N.W. Recalcitrant (homoiohydrous) seeds: the enigma of their desiccation-sensitivity. **Seed Science Technology**, Zürich, v.18, p.297-310, 1990.

BERJAK, P.; WALKER, M.; MYCOCK, D.J.; WESLEY-SMITH, J.; WATT, P.; PAMMENTER, N.W. Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Japan/International; Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p.140-155.

BEWLEY, J.D. Membrane changes in seeds as related to germination and the perturbations resulting from deterioration in storage. In: McDONALD, M.B.; NELSON, C.J. **Physiology of seed deterioration**. Madison: CSSA, 1986. v.11, p. 27-45.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds physiology of development and germination**, 2 ed. New York: Plenum press, 1994. 445p.

BINGHAM, L.J.; HARRIS, A.; McDONALD, L. A comparative study of radicle and coleoptile extension in maize seedlings from age and unaged seed. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.22, p.127-139, 1994.

BRACCINI, A.L.; BRACCINI, M.C.L.; SCAPIN, C.A. Mecanismos de deterioração das sementes: aspectos bioquímicos e fisiológicos. **Informativo ABRATES**. Londrina: ABRATES, v.11, n.1, p.10-15, 2001.

BREESE, E.L. **Regeneration and multiplication of germplasm resources in seed genebanks: the scientific background**. Rome: IBPGR, 1989. 69p.

CACCAVALE, A.; LAMBARDI, M.; FABBRI, A.; SCANNERINI, S.; BAKER, A.; CHARLWOOD, B.V.; DAMIANO, C.; FRANZ, S.; GIANINIZZI, S. Cryopreservation of woody plants by axillary bud vitrification: a first approach with poplars. **Acta Horticultural**, v.457, p.79-83, 1998.

CARVALHO, M.L.M.; CAMARGO, R. Aspectos bioquímicos da deterioração de sementes. **Informativo ABRATES**, Londrina: ABRATES, v.13, n.1,2, p. 66-88, 2003.

CGIAR (Consultive Group on International Agricultural Research) **People and plants: the development agenda**. Rome, IBPGR, 1993.

CHAUHAN, K.P.S. the incidence of deterioration and its localization in aged seeds for soybean and barley. **Seed Science Technology**, Zurich, v.13, p.769-773, 1985.

CHRISTENSEN, N.M. Microflora and seed deterioration. In: ROBERTS, E.H. (ed.). **Viability of seeds**. London: Chapman and Hall, 1972. p.59-93.

COLBEAR, P. Mechanisms of seed deterioration. In: BASRA, A.S. (ed.). **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**. New York: Food Products Press, 1995. p.223-277.

COPELAND, L.O. **Principles of seed science and technology**. Minneapolis: Burgess Publishing Company, p. 212, 1976.

COPELAND, L.O.; McDONALD, M.B. **Seed Science and Technology**. New York: Chapman and Hall, 1995. 409p.

DELOUCHE, J.C.; BASKIN, C.C. Accelerated ageing techniques for predicting the relative storability of seed lots. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, n.3, p.427-452, 1973.

DELVALLÉE, I.; GUILLAUD, J.; BECKERT, M.; DUMAS, C. Cryopreservation of immature maize embryos after freeze-hardening in the ear and *in vitro*. **Plant Science**, v.60, p.129-136, 1989.

DEREUDRE, J.; BLANDIN, C.; 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. Résistance d'apex caulinares de vitro-plants de Poirier (*Pyrus communis* L. cv Beurré Hardy), enrobés dans l'alginate, à une déshydratation puis à une congélation dans l'azote liquide: Effet d'un endurcissement préalable au froid. **C. R. Academic science Paris Serial**, v.3, n.310, p. 317-323, 1990.

DICKIE, J.B.; SMITH, R.D. Observations on the survival of seeds of *Agathis* spp stored at low moisture contents and temperature. **Seed Science Research**, v.5, p.5-14, 1995.

DODDS, J.H. ***in vitro* methods for conservation in plant genetic resources**. Chapman and Hall, London, 1991, 247p.

DUMET, D.; BENSON, E.E. The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. In: EGELMANN, F.; TAKAGI, H. **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Japan International Research Center for Agricultural Science, tsukuba, Japan; International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy (JIRCAS/IPGRI). 2000. p. 43-56.

DUMET, D.; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUSSERT, S.; DUVAL, Y. Effects of various sugars and polyols on the tolerance to desiccation and freezing of oil plam polyembryonic cultures. **Seed Science Research**, v.4, p.307-313, 1994.

EIRA, T.S.M.; REIS, R.B.R. **Recursos genéticos e biotecnologia- Banco de sementes de café em criopreservação: Experiência inédita no Brasil**. <[http://www.giacometti.org.br/htm/artigo\\_lista.cfm](http://www.giacometti.org.br/htm/artigo_lista.cfm)> Acesso em: 13 de setembro 2004.

ELLIS, R.H. Seed storage in national centers. In: IRRI (Manila, Filipinas). **Rice germplasm collecting, preservation, use**. Manila, 1991. p. 81-85.

ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal Experience of 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 Experience of Botany**, v.42, n.238, p.653-657, 1991.

ELLIS, R.H.; PIETRA FILHO, C. The development of seed quality in spring and winter cultivars of barley and wheat. **Seed Science Research**, Wallingford, v.2, p.9-15, 1992.

EL-MORSY, A.A.; MILLET, B. Rhythmic growth and optimization of micropropagation: the effect of excision time and position of axillary buds on *in vitro* culture of *Citrus aurantium* L. **Annals of Botany**, London, v.78, p.197-202, 1996.

ENGELMANN, F. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm current research progress and application**. Japan International Research Center for Agricultural Science, Tsukuba, Japan; International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy (JIRCAS/IPGRI). 2000. p. 8-20.

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.

ESAU, K. A semente. In: ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: Guadalupe, 1974. p. 256-263.

FABRE, J.; DEREUDDRE, 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.

FAIAD, M.G.R.; SALOMÃO, A.N.; SANTOS, I.R.I. **Estratégias e resultados da conservação de germoplasma-semente a longo prazo**.

<[http://www.giacometti.org.br/artigo\\_exibe.cfm](http://www.giacometti.org.br/artigo_exibe.cfm)> Acesso em: 25 de fevereiro 2004.

FALEIRO, F.G. **Preservação da variabilidade genética de plantas: um grande desafio**. <<http://boletimpecuario.com.br/artigos/showartigo.php>> Acesso em: 23 de março, 2004.

FIND, J.L.; KRISTENSEN, M.M.H.; NOGAARD J.V.; KROGSTRUP, P. Effect of culture period and cell density on regrowth following cryopreservation of embryogenic suspension cultures of Norway Spruce and Sitka Spruce. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. V.53, p.27-33, 1998.

FOR-LLOYD, B.; JACKSON, M. **Plant genetic resources: an introduction to their conservation and use**. London: Edward Arnold, 1986. 56p.

FRANKS, F. The properties of aqueous solutions at subzero temperatures. In: FRANKS, F. **Water: a comprehensive treatise**. New York, Plenum Press, 1982, p.215-218.

FREIRE, A. B.; FREIRE, M.S.; ZIMMERMANN, F.J.P. Monitoramento de germoplasma de arroz em câmara de conservação. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.26, n.5, p.943-948, 2002.

FREIRE, E.C. Algodão colorido. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, v.2, n.9, p.36-39, 1999.

FREIRE, E.C.; ANDRADE, F.P.; FARIAS, F.J.C.; COSTA, J.N.; MOREIRA, J.A.N.; VIEIRA, M.; FARIAS, R.H. **Melhoramento do algodão colorido no Nordeste do Brasil**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 1997. 6p. (EMBRAPA-CNPA, Pesquisa em Andamento, 49).

FREITAS, S.C. **Determinação de equilíbrio higroscópico e viabilidade de sementes de ipê amarelo (*Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nichols) armazenadas em diferentes umidades relativas**. 1978. 24p. (Dissertação de mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

FU, J.R.; LU, X.H.; HCEN, R.Z.; ZHANG, B.Z.; LIU, Z.S.; CAI, C.Y. Osmoconditioning of peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds with PEG to improve e vigour and biochemical activities. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.16, p.87-95, 1988.

FUKAI, S. Cryopreservation of chrysanthemum shoot tips. **Scientia Horticulturae**, v.45, p.167-174, 1990.

GIACOMETTI, D.C.; GOES, M. Conservação de Germoplasma de espécies frutíferas pelo uso da biotecnologia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.8, n.3, p.39-46, 1986.

GIL, N.S.; DELOUCHE, J.C. Deterioration of seed corn during storage. **Proceeding of the Association of Official Seed Analysts**, Virgínia, p.33-66, 1973.

- GOEDERT, C.; SALOMÃO, A.N.; FAIAD, M.G. Germoplasma, o que é isso?. **Seed News**, Pelotas, v.1, n.3, p.22-27, 2002.
- GONZALES-RIO, F.; GURRIARAN, M.J.; GONZALES-BENITO, E.; REVILLA, M.A. Desiccation and cryopreservation of olive (*Olea europea* L.) embryos. **Cryo-Letters**, v.15, p.337-342, 1994.
- GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; CARVALHO, J.M.F.C.; PÉREZ, C. Effect of dessiccation and criopreservation on the germination of embrionic axés and seeds of cotton. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.33, n.1, p.17-20, 1998.
- GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; CLAVERO-RAMÍREZ, I.; LÓPEZ-ARANDA, J.M. The use of cryopreservation conservation of vegetatively propagated crops. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v.2, n.3, p.341-351, 2004.
- GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; HERRADON, E.; MARTÍN, C. The development of a protocol for the encapsulation-desiccation and in vitro culture of embryonic axes of *Quercus suber* L. e *Q. elix* L. **Silvae Genética**, v.48, p.25-28, 1999.
- GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; PÉREZ, C. Cryopreservation of nodal explants of an endangered plant species (*Centaureum rigualii* Esteve) using the encapsulation-dehydration method. **Biodiversity and Conservation**, Madrid, v.6, p.583-590, 1997.
- GOSH, J.; NANDI, B. Deteriorative abilities of some common storage fungi of wheat. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.14, p.141-149, 1986.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnica e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1990. p.99-169.
- GURGEL, J.T.A. A presença de carúncula na germinação de bagas de mamona. **O solo**, Piracicaba, v.44, n.1, p.57-59, 1952.
- HARDING, K.; BENSON, E.E. A study of growth, flowering, and tuberization in plants derived from cryopreserved potato shoot-tips: Implications for in vitro germplasm collections. **Cryo-Letters**. v.15, p.59-66, 1994.
- HARRINGTON, J.F. Seed storage and longevity. In: KOSLOWSKY, T.T. (Ed.) **Seed biology**. New York: Academic Press, 1972. v.3, p. 145-245.

HASAN, S.M.Z.; TAKAGI, H. Alginate-coated nodal segments of yam (*Dioscorea* spp.) for germplasm exchange and distribution. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, v.103, p.32-35, 1995.

HIRSH, A.G. (1987) Vitrification in plants as a natural form of cryoprotection. **Cryobiology**, v.24, p.214-228, 1987.

IBPGR (International Board For Plant Genetic Resources). Consultative Group on International Agricultural Research (Roma, Italia). **Report of the third external review of the International Board for Plant Genetic Resources**. Rome, 1991. 85p.

IBPGR (International Board For Plant Genetic Resources). Consultative Group on International Agricultural Research (Roma, Italia). **Plant genetic resources- the key to survival**. Rome, 1992. 2p.

KARTHA, K.K. Meristem culture and germplasm preservation. In: KARTHA, K.K. **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1985. p.115-134.

KARTHA, K.K.; LEUNG, N.L.; GAMBORG, O.L. Freeze-preservation of pea meristems in liquid nitrogen and subsequent plant regeneration. **Plant Science Letters**, v.15, p.7-16, 1979.

KONONKOV, P.F. DUDINA, Z.N. Fungi on vegetable crop seeds stored in conditions of high relative humidity and temperature. **Seed Science and Technology**, Rockville, v.88, p. 829-832, 1988.

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, CA, Academic Press, 1995.

LAGO, A.A.; ZINKE, E.; RAZERA, L.F.; BANZATTO, N.V.; SAVY FILHO, A. Dormência em sementes de três cultivares de mamona. **Bragantia**, v.38, p.41-44, 1979.

LEOPOLD, A.C. Coping with desiccation. In: ALSCHER, J.G.; CUMMING, J.R. (Eds) **Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms**. New York, Wiley-Liss, 1990. p. 37-56.

MARUYAMA, E.; ISHII, K.; KINOSHITA, I. Alginate encapsulation technique and cryogenic procedures for long-term storage of the tropical Forest tree *Guazuma crinita* Mart. in vitro cultures. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v.32, p.301-309, 1998.

MATTHEWS, S. Physiology of seed ageing. **Outlook on Agriculture**. Grã-Bretanha, v.14, n.2, p.89-94, 1985.

MAUNEY, J.R. Anatomy and morphology o cultivated cottons. In: KOHEL, R.J.; LEWIS, C.F. **Cotton**. Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy, 1984. p.59-81.

MAZUR, M.L. Kinetics o 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, 1969.

MAZZANI, B. Euforbiáceas oleaginosas Taitago. In: MAZZANI, B. **Cultivo y mejoramiento de plantas oleaginosas**. Caracas, Venezuela: Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, 1983. p.227-360.

McDONALD, M.B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**. Zurich, v.27, p.177-237, 1999.

McGEE, D.C. Introduction. In: Symposium on Deterioration mechanisms in seeds. **Phytopatology**, St. Paul, v.37, n.2, p.314-317,1983.

MOLINA, S.M.; SCHOBERT, C. Micropropagation of *Ricinus communis*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.147, p.270-272, 1996.

MORALES, E.A.V.; VALOIS, A.C.C.; NASS, L.L. **Recursos Genéticos Vegetales**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1997. 78p.

MYCOCK, D.J.; BERJACK, P. The implication of seed-associated mycoflora during storage. In: KIGEL, J.; GALILI. **Seed Development and Germination**, Marcel Dekker, p. 747-766, 1995.



- NKANG, A.; OMOKARO, D.; EGBE, A. Effects of desiccation on the lipid peroxidation of peroxidase and polyphenoloxidase in seeds of *Tealfairia occidentalis*. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.28, n.1, p.1-9, 2000.
- NÓBREGA, M.B.M.; ANDRADE, F.P.A.; SANTOS, J.W.; LEITE, E.J. Germoplasma. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: EMBRAPA-CIT, 2001, p.257-281.
- OLIVEIRA, A.B.; QUEIROZ, J.A.; MENESES, C.H.S.G.; CARTAZO, W.V.; SUASSUNA, N.D. Efeito do tempo de embebição em água e remoção da carúncula na germinação de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.). In: EMBRAPA-CNPA. **I Congresso Brasileiro de Mamona**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 2004. CD-ROM.
- OLIVEIRA, E.T.; GROTHGE, M.T.; CONÇALVES, A.N. Micropropagação de *Pinus* tropicais. In: CROCOMO, O.J.; CHARP, W.R.; MELO, M. **Biotecnologia para produção vegetal**. Piracicaba: CEBETC/FEALQ. 1991. p.544-370.
- PAIVA, J.R. Conservação *ex situ* de recursos genéticos de plantas na região tropical úmida. **Acta Amazônica**. v.24, n.1/2, p.63-80, 1994.
- 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.
- PISTORIUS, R. **Scientists, plants and politics: a history of the plant genetic resources movement**. Rome: IPGRI, 1997. 134p.
- PITA VILLAMIL, J.M. **Crioconservación de semillas**. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola, 26. Campina Grande, PB. 1997, 55p. (Minicurso).
- 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.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1985. p.145-156.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura/AGIPLAN, 1977. 78p.

- POTTS, S.E.; LUMPKIN, T.A. Cryopreservation of *Wasabia* spp. Seeds. **Cryo-Letters**, v.18, p.185-190, 1997.
- QUEIROZ, J.A.; OLIVEIRA, A.B.; MENESES, C.H.S.G.; CARTAZO, W.V.; SUASSUNA, N.D. Efeito da remoção da carúncula, tratamento químico e tempo de armazenamento na germinação de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.). In: EMBRAPA-CNPA. **I Congresso Brasileiro De Mamona**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 2004. CD-ROM.
- RAMALHO, M.A.T.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.B. **Genética na agropecuária**. Lavras: Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão, 1990. 359p.
- RAO, N.K.; ROBERTS, E.H.; ELLIS, R.H. Loss of viability in lettuce seeds and the accumulation of chromosome damage under different storage conditions. **Annals of Botany**, London, v.60, p.85-96, 1987.
- REED, B.M.; PAYNTER, C.L.; DeNOMA, J.; CHANG, Y. Techniques for medium- and long-term storage of pear (*Pyrus* L.) genetic resources. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, v.115, p.1-5, 1998.
- RIBEIRO FILHO, J. **Cultura da mamoneira**. Viçosa: UFV, 1966. 75p.
- ROBERTS, E.H. Lost of viability: ultrastructural and physiological aspects. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, p. 539-545, 1973a.
- ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, p.499-514, 1973b.
- ROBERTS, E.H. **Seed ageing: the genome and its expression**. In.: Senescence and ageing in plants. San Diego: Academic Press, 1988, p.465-498.
- ROCHA, M.S. **Crioconservação e cultivo *in vitro* de sementes de algodão colorido**. Campina Grande, 2004. 112p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande.
- ROOS, E.F. Induced genetic changes in seed germplasm during storage. In: KHAN, A.A. (ed.). **The physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination**. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1982. p.409-434.

RUNTHALA, P.; JANA, M.K.; MOHANAN, K. Cryopreservation of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) embryonic axes for germplasm conservation. **Cryo-Letters**, Cambridge, v.14, p.335-338, 1993.

RUSSEL, P.J. **Genetics**. 2.ed. Glenview. Scott: Foresman, 1988. 913p.

SACKVILLE, H.N.R.; CHORLTON, K.H. **Regeneration of accessions in seed collections: a decision guide**. Rome: IPGRI, 1997, 75p.

SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry, 32. Cryopreservation of plant germplasm I**. Berlim, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1995, p.53-69.

SAKAI, A. Potentially valuable cryogenic procedures for cryopreservation of cultured plant meristems. In: RAZDAN, M.K.; COCKING, E.C. **Conservation of Plant Genetic Resources In Vitro: General Aspects**. Science Publishers Inc., Enfield, USA, v.1, p.53-66, 1997.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OYAMA, I. Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Obs. var. *brasiliensis* Tanaka) cooled to  $-196^{\circ}\text{C}$ . **Journal of Plant Physiology**. v.137, p.465-470, 1991.

SAKAI, A.; LARCHER, W. **Frost survival of plants. Responses and adaptation to freezing stress**. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, 1987.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.12, n. (especial), p. 70-84, 2000.

SANTOS, I.R.I.; SALOMÃO, A.N.; MUNDIM, R.C. RIBEIRO, F.N.S. **Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de café (*Coffea arabica* L.)**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 2002. 4p. (EMBRAPA-CENARGEN. Comunicado Técnico, 69).

SANTOS, I.R.I.; STUSHNOFF, C. Cryopreservation of embryonic axes of *Citrus* species by encapsulation-dehydration. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, v.131, p.36-41, 2002.

SANTOS, R.F.; BARROS, M.A.L.; MARQUES, F.M.; FIRMINO, P.T.; REQUIÃO, L.E.G. Análise econômica. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: EMBRAPA-SCT, 2001, p.17-35.

- SASSERON, J.L. **Característica dos grãos armazenados**. Viçosa: CENTREINAR, 1980. 65p.
- 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.
- SENERATHA, T.; GUSSE, J.F.; MCKERSIE, B.D. Age-induced changes in cellular membranes of imbibed soybean axes. **Physiologia Plantarum**, v.73, p.85-91, 1988.
- SEVAST'YANOVA, L.B. Germination of seeds. In: MOSHKIN, V.A. **Castor**. New Delhi: Amerind, 1986. p. 34-35.
- SIMPSON, D.M.; ADAMSON, C.L.; STONE, G.M. The longevity of cotton seed. **Agronomy Journal**, v.45, n.8, p.391, 1953.
- SMITH, M.T.; BERJACK, P. Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccations of seed associates mycoflora during storage. In: JAYME, K.; GALILI, G. **Seed Development and Germination**. New York: Basel-Hang Yong, 1995, p. 701-746.
- STANWOOD, P.C. Cryopreservation of seed germplasm – a preliminary guide to the practical preservation of seed germplasm in liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>, -196°C). In: IBPGR. **Report of the Second Meeting**. Advisory Committee on Seed Storage, p. 8-27, 1984.
- STANWOOD, P.C. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: KARTHA, K. K. **Plant Cryopreservation**. CRC Press, p. 199-225, 1985a.
- STANWOOD, P.C. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: KARTHA, K. K. **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1985b, p. 199-225.
- STANWOOD, P.C.; BASS, L.N. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.9, p. 423-437, 1981.
- STANWOOD, P.C.; ROOS, E.E. Seed storage of several horticultural species in liquid nitrogen (-196°C). **HortScience**, v.14, p. 628-630, 1979.
- 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. **Water and life: comparative analysis of water relationships at the organismic, cellular and molecular level**. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1992, p.338-362.

STREET, H.E.; OPIK, H. Germinação. In: STREET, H.E.; OPIK, H. **Fisiologia das angiospermas: crescimento e desenvolvimento**. São Paulo: Polígono, 1974. p. 7-34.

STUSHNOFF, C.; SEUFFERHELD, M. Cryopreservation of Apple (*Malus species*) Genetic Resources. In.: BAJAJ, Y.P.S. ed, **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, vol. 32, Cryopreservation of Plant Germplasm I. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1995, p.87-101.

SUNG, J.M.; JENG, T.L. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated ageing of peanut seed. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.91, n.1, p.51-55, 1994.

TANNOURY, M.; VINTÉJOUX, C.; DEREUDDRE, J. Cryopreservation par encapsulation et déshydratation d'apex d'eillet (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivés *in vitro*. **Acta Botanica Callica**, v.142, n.5, p.415-424, 1995.

TORIBIO, M.; CELESTINO, C. El uso de la biotecnología en la conservación de recursos genéticos forestales. **Investigación Agraria**, Madrid, n.2, p.249-259, 2000.

TOWILL, L.E. Improved survival after cryogenic exposure of shoot tips derived from in vitro plantlet culture of potato. **Cryobiology**. v.20, p.567-573, 1983.

TOWILL, L.E. Survival of ultra-low temperatures of shoot-tips *Solanum tuberosum* Group *andigena*, *phureja*, *stenotomum* and other tuber-bearing *Solanum* species. **Cryo-Letters**. v.5, p.319-326, 1984.

UEMURA, M.; SAKAI, A. Survival of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot apices frozen to the temperature of liquid nitrogen. **Plant and Cell Physiology**, v.21, n.1, p.85-94, 1980.

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.

UNITED STATES. NATIONAL PLANT GERMPLASM SYSTEM. Washington: National Academy Press, 1991. 171p. (National academy of Sciences. Managing Global Genetic Resources).

URAGAMI, A. Cryopreservation of cultured cells and organs of vegetables. In: **cryopreservation of Plant Genetic Resources**, Technical assistance activities for genetic resources projects N°6, **JICA**, Japan, 1993.

VALOIS, A.C.C. Biodiversidade, biotecnologia e propriedade intelectual (um depoimento). **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v.15, n.especial, p.21-31, 1998.

VAN PIJLEN, J.G.; KRAAK, H.L.; BINO, R.J. DE VOS, C.H.R. Effects of ageing and osmorpriming on germination characteristics and chromosome aberrations of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds. **Seed Science and Technology**, Madson, v.23, p. 823-830, 1995.

VANDENBUSSCHE, B.; WEYENS, G.; PROFT, M. Cryopreservation of in vitro sugar beet (*Beta vulgaris* L.) shoot tips by a vitrification technique. **Plant Cell Reports**, Tienen, v.19, p.1064-1068, 2000.

VENCOVSKY, R. **Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasma de espécies alógamas**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1986. 15p. (EMBRAPA-CENARGEN. Boletim de Pesquisa, 1).

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

VERTUCCI, C.W. Effects of cooling rate on seeds exposed to liquid nitrogen temperatures. **Plant physiology**, v.90, p.1478-1485, 1989.

VERTUCCI, C.W.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W.; CRANE, J. Cryopreservation of embryonic axes of an homeohydrous (recalcitrant) seed in relation to calorimetric properties of tissue water. **Cryol-Letters**, v.12, p.339-350, 1991.

VIEIRA, M.L.C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, v.3, n.14, p.18-20, 2000.

VIEIRA, R.M.; BELTRÃO, N.E.M. Produção de sementes do algodoeiro. In: BELTRÃO, N.E.M. **O agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília: EMBRAPA-CTT, v.1, 1999, p.430-453.

WANG, J.; GE, J. LIU, F.; HUANG, C. Ultrastructural changes during cryopreservation of rice (*Oryza sativa* L.) embryogenic suspension cells by vitrification. **Cryo-letters**, v.19, p. 49-54, 1998.

WEISS, E.A. **Oil seed crops**. London: Longman, 1983. 659p.

WESLEY-SMITH, J.; VERTUCCI, C.W.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W.; CRANE, J. Cryopreservation of desiccation-sensitive axes of *Camellia sinensis* in relation to dehydration, freezing rate and the thermal properties of tissue water. **Journal Plant Physiology**. v.140, p.596-604, 1992.

WITHERS, L.A. In vitro conservation. **Biol. J. Linn. Sci.** v.43, p.31-42, 1991.

WITHERS, L.A. Preservation of germplasm. **International Review of Cytology**, v.11B, p.101-136, 1980.

WITHERS, L.A.; ENGELMAN, F. In vitro conservation of plant genetic resources. In: ALTMAN, A. **Agricultural Biotechnology**. Marcel Dekker, Inc. 1998.

YAMADA, T. Cryopreservation of forage crops. In: **Cryopreservation of plant genetic resources**, Technical assistance activities for resources projects N°6, JICA, Japan, 1993.

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.

## CAPÍTULO 2

### **Criopreservação de Explantes de Algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) pelos Métodos da Vitrificação e Encapsulamento-dessecação**

#### 1 RESUMO

LOPES, Kilson Pinheiro. **Criopreservação de explantes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) pelos métodos da vitrificação e encapsulamento-dessecação**. Areia: UFPB/CCA, 2005. p.51-86. (Tese-Doutorado em Agronomia)<sup>3</sup>

Objetivou-se avaliar procedimentos de criopreservação de explantes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) e contribuir com a conservação a longo prazo dos recursos genéticos dessa espécie. Sementes de algodoeiro da cultivar BRS 201 foram devidamente esterilizadas e semeadas *in vitro*, para obtenção da plântula matriz após 25 dias de cultivo, quando se procedeu a excisão dos ápices caulinares e nós cotiledonares de aproximadamente 5 a 7 mm. Os explantes obtidos foram submetidos aos processos de vitrificação e encapsulamento-dessecação. A vitrificação se deu por meio do pré-cultivo por 48 horas, em meio MS líquido contendo DMSO (0; 5; 10 e 15%) e/ou sacarose (0; 0,1; 0,25 e 0,5 M). No encapsulamento-dessecação, explantes foram submetidos ou não ao pré-cultivo por 24 horas, em meio MS líquido suplementado com 0,3 M de sacarose e então mergulhados na solução de encapsulamento, contendo 3% de alginato de sódio, formando uma bolha que envolveu o explante, as quais foram mantidas por 12 horas em meio MS líquido com 0,75 M de sacarose sob agitação à 130 rpm. As bolhas contendo os explantes foram submetidas a dessecação por 0, 3, 6 e 9 horas na câmara de fluxo laminar ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Os explantes vitrificados e os encapsulados foram colocados em tubos criobiológicos de polipropileno estéreis de 4,5 mL (quatro réplicas de 10 explantes/tubo), os quais foram devidamente selados e imersos diretamente no nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) durante cinco dias. O descongelamento dos explantes se deu pela imersão dos criotubos em água à  $38\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 1-2 minutos (banho maria) e sob condições de ambiente à  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos, procedendo-se em seguida seu cultivo em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio MS com  $30\text{ g.L}^{-1}$  de glicose,  $10\text{ mL.L}^{-1}$  de cloreto de magnésio e  $2\text{ g.L}^{-1}$  de gelrite e pH ajustado para 5,7. Avaliações dos explantes foram realizadas antes e após criopreservação, por meio da porcentagem de regeneração, número e comprimento de brotos emitidos após quatro semanas de cultivo. O pré-cultivo dos explantes no meio de vitrificação com DMSO em concentração superior a 5% ou associado com sacarose a 0,1; 0,25 e 0,5 M afetou a viabilidade dos explantes. Nós cotiledonares e ápices caulinares encapsulados com alginato de sódio não toleram dessecação em câmara de fluxo laminar ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) por período superior a três e seis horas, respectivamente. Não houve regeneração, após criopreservação, dos explantes de algodoeiro submetidos aos métodos de vitrificação e de encapsulamento-dessecação.

---

<sup>1</sup> Comitê Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida – UFCG/CCT (Orientador), Dra. Julita Maria Frota Chagas Carvalho – EMBRAPA/CNPA, Prof<sup>a</sup>. Dra. Riselane de Lucena Alcântara Bruno – UFPB/CCA.



## 2 ABSTRACT

LOPES, Kilson Pinheiro. **Cryopreservation of explants of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by methods of the vitrification and encapsulation-dehydration.** Areia: UFPB/CCA, 2005. p.51-86. (Thesis - Doctorate in Agronomy)\*

It was aimed at to evaluate procedures of cryopreservation of cotton explants (*Gossypium hirsutum* L.) and to contribute with the conservation long term of the genetic resources of that species. Cotton seeds of cv. BRS 201 were properly sterilized and sowed in vitro for the obtaining of the plantlets after 25 days of cultivation, when it was proceeded the excised of the shoot apices and nod cotiledonare of approximately 5 to 7 mm. The explants obtained were submitted to the processes of vitrification and encapsulation-dehydration. The vitrification felt through the preculture for 48 hours in MS liquid medium containing DMSO (0; 5; 10 and 15%) and/or sucrose (0; 0,1; 0,25 and 0,5 M). In the encapsulation-dehydration, explants were submitted or not to the preculture for 24 hours MS liquid medium supplemented with 0,3 M of sucrose and then dived in the encapsulation solution, containing 3% of Na-alginate, forming a bead that involved the explant, which were maintained by 12 hours in MS liquid medium with 0,75 M of sucrose, on a rotary shaker at 130 rpm. The beads containing the explants was submitted to the desiccation by 0, 3, 6 and 9 hours in the flow camera to laminate ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). The vitrified and encapsulated explants they were them placed in cryotubes of sterile polipropilene of 4,5 mL (four responses of 10 explants/cryotubes), and directly plunged into liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) for five days. The thawing of the explantes was performad by placing the cryotubes in  $38\pm 2^{\circ}\text{C}$  water bath for approximately 1-2 min and under room temperature condition to the  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  for 60 min, being proceeded your cultivation soon after in tubes containing 10 mL of MS medium with 30 g.L<sup>-1</sup> of glucose, 10 mL.L<sup>-1</sup> of chloride of magnesium and 2 g.L<sup>-1</sup> of gelrite and pH adjusted for 5,7. Evaluations of the explants were accomplished before and after cryopreservation, through the regeneration percentage, number and length of sprouts emitted after four weeks of cultivation. The preculture of the explants in the vitrification medium with DMSO in superior concentration to 5% or associated with sucrose to 0,1; 0,25 and 0,5 M affected the viability of the explants. nod cotiledonare and shoot apices encapsulated with alginate of sodium they don't tolerate desiccation for superior period at three and six hours, respectively. There was not regeneration, after cryopreservation, of the cotton explants submitted to the vitrification and encapsulation-dehydration methods.

---

\*Guidance Committee: Prof. Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida – UFCG/CCT (Orientador), Dra. Julita Maria Frota Chagas Carvalho – EMBRAPA/CNPA, Prof<sup>a</sup>. Dra. Riselane de Lucena Alcântara Bruno – UFPB/CCA.

### 3 INTRODUÇÃO

O melhoramento de plantas tem contribuído para o aumento da produção em diversas culturas comerciais de grande relevância em todo o mundo. A obtenção de variedades de alto rendimento e resistência a pragas e doenças requer que os recursos genéticos desejáveis de determinada espécie se encontrem disponíveis para sua utilização; desta forma as coleções de germoplasma passam a ter papel fundamental nos programas de melhoramento (SILVA *et al.*, 1997).

O cultivo de meristemas se tornou uma ferramenta indispensável na propagação clonal e na eliminação de patógenos virais de muitas plantas cultivadas (KARTHA *et al.*, 1974; BAJAJ, 1977; KARTHA *et al.*, 1979). Como as células constituintes do meristema são menos diferenciadas e mais uniformes do que aquelas de tecidos maduros, plantas regeneradas pelo cultivo *in vitro* de meristemas devem garantir a recuperação tal qual sua progênie. Além disso, o meristema tem uma maior habilidade para regenerar a planta inteira do que o cultivo de células adultas. Então, a conservação de meristemas excisados em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  (criopreservação), é potencialmente um meio satisfatório e seguro para a conservação de germoplasma vegetal (UEMURA e SAKAI, 1980; KARTHA, 1985).

Os métodos de criopreservação são diversos e empregados de acordo com a natureza do material a ser conservado. Procedimentos criogênicos simplificados como vitrificação (SAKAI *et al.*, 1990) e encapsulamento-dessecação (FABRE e DEREUDDRE, 1990) que, eliminam a necessidade de congeladores programáveis de custo elevado, garantindo fácil obtenção do material após congelamento com elevada taxa de recuperação, são preferidos na criopreservação de germoplasma vegetal (ENGELMANN, 1997). Porém, na maioria dos casos, as espécies criopreservadas são limitadas a culturas hortícolas, plantas ornamentais e fruteiras, e há alguns relatos com forrageiras como o trevo branco (*Trifolium repens* L.) (YAMADA *et al.*, 1991) e gramíneas como arroz (*Oriza sativa* L.) (HUANG *et al.*, 1995) e cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. Hybrids) (PAULET *et al.*, 1993).

A vitrificação é alcançada pela redução da água congelável intra e extracelular, por meio da exposição dos tecidos das plantas a misturas

crioprotetoras muito concentradas ou pela dessecação física e subsequente congelamento rápido, geralmente, pela imersão direta no nitrogênio líquido. Segundo Vieira (2000), dentre os protetores químicos utilizados na solução de vitrificação destacam-se o dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, glicerol, etileno glicol, propileno glicol, dentre outros. No entanto, segundo Kartha (1985) e Sakai (1995), o emprego de crioprotetores químicos podem causar citotoxicidade e estresse osmótico, levando à morte das células ou modificando sua resposta morfogenética em cultura. Diante disto, nos últimos anos, açúcares como a sacarose, trealose e glucose têm sido utilizados como substâncias crioprotetoras, por não apresentam toxicidade para as células vegetais mesmo quando se acumulam em grande quantidade no citoplasma (WITHERS, 1991; YAMADA, 1993; DUMET *et al.*, 1994). As técnicas de criopreservação baseadas na vitrificação são geralmente simples e aplicáveis a estruturas muito complexas como embriões e ápices caulinares (WITHERS e ENGELMANN, 1997).

Meristemas de numerosas espécies vegetais foram criopreservados com sucesso usando o método da vitrificação (YAMADA *et al.*, 1991; TOWILL e JARRET, 1992; MATSUMOTO *et al.*, 1995; TAKAGI *et al.*, 1997). Vandebussche *et al.* (2000), empregou o pré-cultivo de ápices de beterraba (*Beta vulgaris* L.) em meio com uma mistura de 2 M de glicerol e 0,4 M de sacarose (20°C) e desidratação com PVS2 (10% de polietileno + 10% de glucose + 10% de DMSO), obtendo elevadas taxas de recuperação após congelamento em nitrogênio líquido. Procedimento semelhante foi realizado por González-Arno *et al.* (2000), com ápices de variedade de *Ananás comosus*, empregando 1 M de glicerol e 0,75 M de sacarose por 25 minutos e desidratação com PVS2, com recuperação variando de acordo com a variedade estudada. Uragami *et al.* (1990), pré-cultivando ápices de aspargos (*Asparagus officinalis*) em meio com alta concentração de sacarose seguida por dessecação e imersão direta em nitrogênio líquido garantiram bons resultados na regeneração após descongelamento.

O método do encapsulamento-dessecação foi baseado na tecnologia de sementes sintéticas, desenvolvida por Fabre e Dereuddre (1990), consistindo da inclusão de ápices em bolhas de alginato e seu subsequente cultivo em uma solução com elevada concentração de sacarose, usada como crioprotetor, seguida pela desidratação física e imersão direta em nitrogênio líquido, evitando

deste modo o uso de crioprotetores químicos (BERJAK *et al.*, 2000). Dentre as vantagens do encapsulamento, CID (2004), afirma que explantes encapsulados podem contribuir muito no intercâmbio de espécies vegetais entre diferentes países. Ápices cultivados em meio enriquecido com sacarose (0,3-0,7M), prévio ao encapsulamento, geralmente, sobrevivem após dessecação e congelamento. A dessecação física é realizada por meio de sílica gel ou em câmara de fluxo laminar (PAULET *et al.*, 1993). O conteúdo de água de aproximadamente 20% (com base no peso fresco) tem garantido elevada sobrevivência após congelamento de explantes vegetais em muitas espécies (SCOTTEZ *et al.*, 1992; NINO *et al.*, 1992; GONZÁLEZ-ARNAO *et al.*, 1996; ENGELMANN, 1997; GONZÁLEZ-BENITO *et al.*, 1998).

A criopreservação, usando o método de encapsulamento-dessecação de ápices, tem sido bem sucedida para algumas espécies vegetais do gênero *Rubus* spp. (REED e YU, 1995) e trevo branco (*Trifolium repens* L.) (YAMADA *et al.* 1991). Em mangostão (*Garcinia mangostona* L.), foram empregados ambos os métodos, vitrificação e encapsulamento-dessecação, mas não foram obtidos resultados satisfatórios (ALIUDIN, 1997).

A presente pesquisa teve como objetivo estudar procedimentos de vitrificação e encapsulamento-dessecação de explantes de algodoeiro, seu efeito imediato e após armazenamento criogênico, sobre sua capacidade de regeneração *in vitro*, como forma de assegurar a conservação, a longo prazo, dos recursos genéticos dessa espécie.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material vegetal e procedimento para obtenção dos explantes**

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Centro Nacional de Pesquisa do Algodão (Embrapa-Algodão), em Campina Grande, PB. Utilizaram-se explantes obtidos de plântulas matrizes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) cultivar BRS 201, cultivadas *in vitro*.

Na obtenção da plântula matriz, sementes de algodoeiro foram devidamente esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio comercial (Brilux) a 40% (v/v), com 2,0-2,5% de cloro ativo, acrescida com 1-2 gotas de

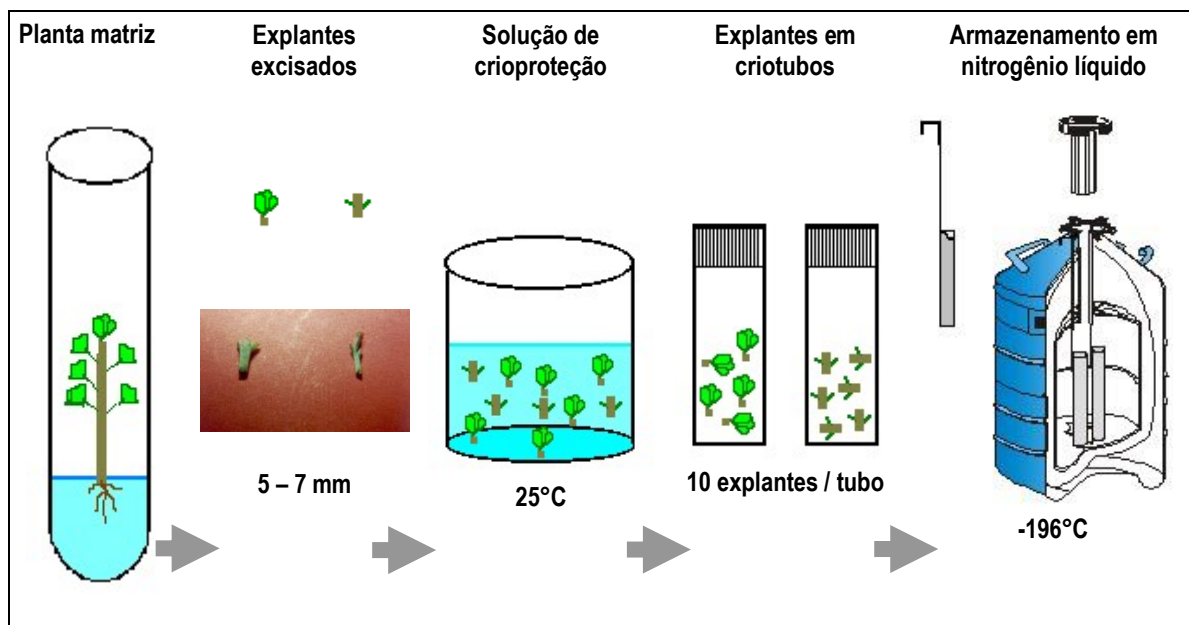
polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween-20<sup>®</sup>), sob agitação, durante 20 minutos, seguida de tríplice lavagem em água bidestilada esterilizada; em seguida e sob condições estéreis da câmara de fluxo laminar, sementes foram postas para germinar em tubos de ensaio de 25 x 250 mm contendo 10 mL de meio com sais minerais MS de Murashige e Skoog (1962) suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 5,5 g.L<sup>-1</sup> de ágar-ágar e pH ajustado para 5,7 antes da adição do solidificante ao meio. Sementes cultivadas foram mantidas na ausência de luz, até protusão da radícula e então levadas para câmara de crescimento, com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16/8 horas (claro/escuro) e intensidade luminosa em torno de 30  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , proporcionada por lâmpadas fluorescentes brancas frias. Após 25 dias de cultivo, procedeu-se, a partir daquelas plântulas, a excisão dos explantes (ápices caulinares e nós cotiledonares de aproximadamente 5 a 7 mm), sob condições assépticas da câmara de fluxo laminar.

#### **4.2 Método da Vitrificação**

Os explantes obtidos foram pré-cultivados em meio MS líquido, contendo um dos agentes crioprotetores ou sua combinação, em diferentes concentrações: dimetilsulfóxido – DMSO (Me<sub>2</sub>SO) 0; 5; 10 e 15 % e sacarose 0; 0,1; 0,25 e 0,5 M e mantidos incubados em câmara de crescimento sob as condições mencionadas acima, por 48 horas (Figura 1).

Para avaliar o efeito da solução crioprotetora na regeneração, parte dos explantes pré-cultivados foi, imediatamente, cultivados *in vitro* e outra parte foi posta em tubos criobiológicos de polipropileno estéreis de 4,5 mL, em número quatro réplicas de 10 explantes por tubo, os quais foram devidamente selados e imersos diretamente no nitrogênio líquido (-196°C) onde permaneceram pelo tempo de cinco dias.

O descongelamento dos explantes crioconservados ocorreu pela imersão dos criotubos, contendo os explantes, em água a 38±2°C (banho maria), durante 1-2 minutos e pela manutenção do material em condições de ambiente (25±2°C) pelo tempo de 60 minutos e, posteriormente, cultivados *in vitro*.



**Figura 1.** Criopreservação de explantes de algodoeiro pelo método da vitrificação.

O cultivo dos explantes foi realizado sob condições assépticas, na câmara de fluxo laminar, em tubos de ensaio de 25 x 150 mm contendo 10 mL de meio MS, com 30 g.L<sup>-1</sup> de glucose, 10 mL.L<sup>-1</sup> de cloreto de magnésio e 2 g.L<sup>-1</sup> de Gelrite e pH ajustado para 5,7 antes do acréscimo do agente solidificante ao meio. Quatro repetições de 10 tubos por tratamento, contendo os explantes, foram mantidas quatro semanas em câmara de crescimento, com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16/8 horas (claro/escuro) e intensidade luminosa em torno de 30  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  proporcionado por lâmpadas fluorescentes brancas frias. Ao final da quarta semana, explantes foram avaliados quanto à porcentagem de regeneração, número de brotos emitidos por explante e comprimento do maior broto.

#### 4.2.1 Procedimento estatístico

Os dados foram analisados segundo o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 x 4, sendo dois explantes (ápice caulinar e nó cotiledonar), quatro concentrações do DMSO (0, 5, 10 e 15%) e quatro concentrações de sacarose (0; 0,1; 0,25 e 0,5 M), procedendo-se análise de variância e regressão polinomial, para cada explante, em função das concentrações de DMSO e sacarose, utilizando-se dos modelos de superfícies de

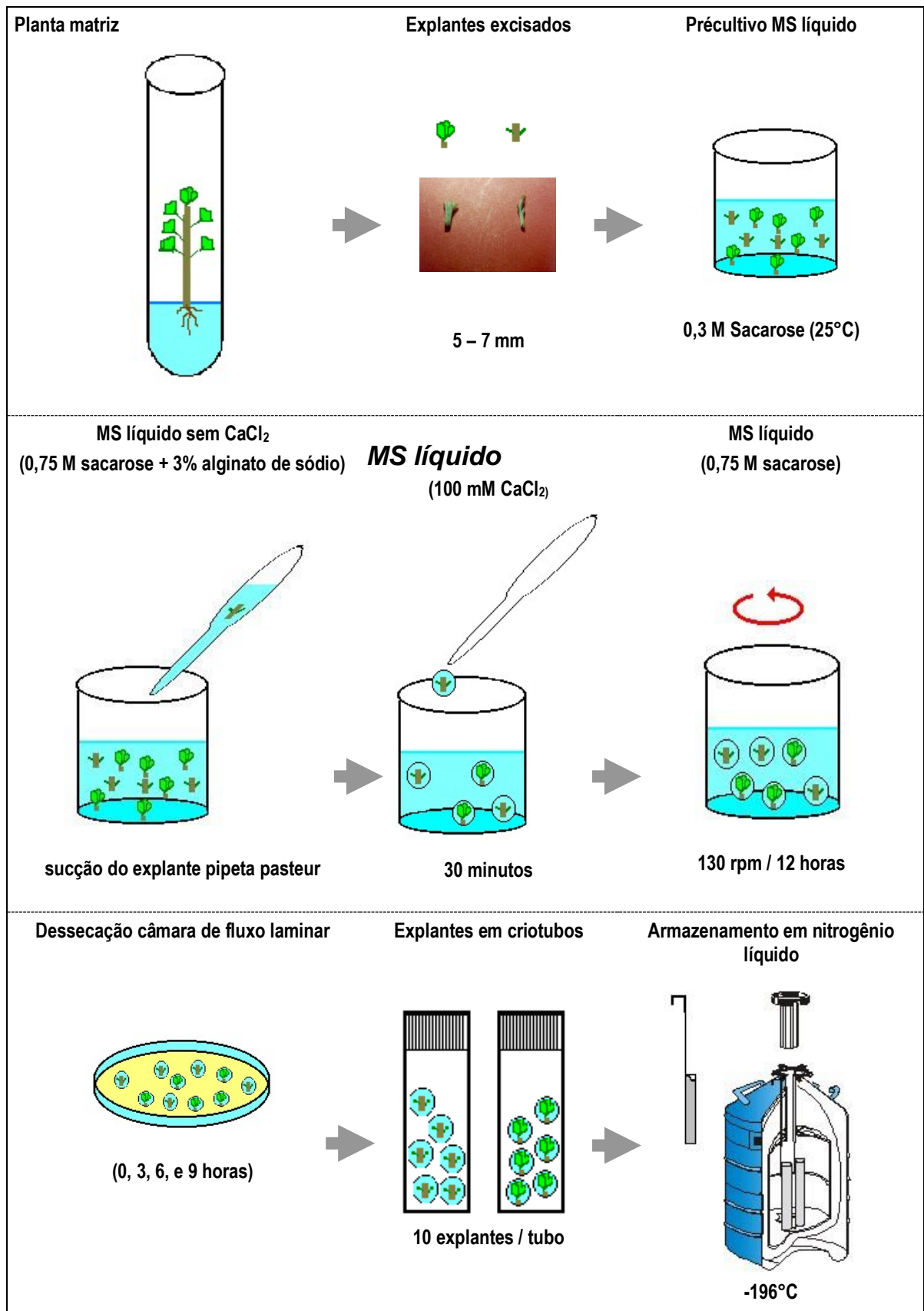
resposta, selecionando-se aquele em que todas as variáveis do modelo apresentaram contribuição significativa.

### **4.3 Método do encapsulamento-dessecação**

Prévio ao processo de encapsulamento, os explantes foram submetidos e não submetidos a uma fase de pré-cultivo em meio MS líquido suplementado com 0,3 M de sacarose, durante 24 horas, incubados em câmara de crescimento regulada a 25°C, com fotoperíodo de 16/8 horas (claro/escuro) e intensidade luminosa em torno de 50  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  proporcionada por lâmpadas fluorescentes brancas frias.

No encapsulamento, explantes foram mergulhados em meio MS líquido com 0,75 M de sacarose sem  $\text{CaCl}_2$  e suplementado com 3% de alginato de sódio. Explantes embebidos nesta solução foram succionados por meio de uma pipeta Pasteur e despejados em meio MS líquido, acrescido de 100 mM de  $\text{CaCl}_2$ , formando bolhas, as quais permaneceram por 30 minutos e, logo em seguida, transferidas para cultivo em meio MS líquido com 0,75 M de sacarose, durante 12 horas, sob agitação a 130 rpm. Os explantes encapsulados foram colocados para dessecar em placas de Petri, sobre folhas de papel de filtro estéreis e mantidas sob condições da câmara de fluxo laminar ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ), por períodos de 0, 3, 6 e 9 horas e, posteriormente, colocados em tubos criobiológicos de polipropileno estéreis de 4,5 mL, em número de quatro réplica de 10 explantes por tubo, os quais foram devidamente selados e colocados diretamente no nitrogênio líquido ( $-196^\circ\text{C}$ ) onde permaneceram por cinco dias (Figura 2).

Para a determinação do conteúdo de umidade, prévio à criopreservação, separaram-se três repetições de 30 explantes encapsulados, provenientes de cada período de dessecação sendo postos para secar em estufa regulada a  $105\pm 2^\circ\text{C}$  por 24 horas, de acordo com González-Benito e Pérez, (1997), cujo conteúdo de água foi obtido pela diferença de peso dos explantes, antes e após secagem, e expresso em porcentagem, com base no peso fresco.



**Figura 2.** Criopreservação de explantes de algodoeiro pelo método do encapsulamento-dessecação.



O descongelamento dos explantes encapsulados, após criopreservação, foi realizado de acordo com o já citado, e bolhas, contendo os explantes, foram cultivadas em tubos de ensaio de 25 x 150 mm contendo 10 mL do meio MS, com 30 g.L<sup>-1</sup> de glucose, 10 mL.L<sup>-1</sup> de cloreto de magnésio e 2 g.L<sup>-1</sup> de Gelrite e pH ajustado para 5,7, antes do acréscimo do agente solidificante ao meio e mantidas sob condições de câmara de crescimento, como referido anteriormente. A avaliação dos explantes ante os procedimentos de encapsulamento e sobrevivência às condições do nitrogênio líquido, foi realizada após quatro semanas, pela porcentagem de regeneração, número de brotos emitidos e comprimento do maior broto.

#### **4.3.1 Procedimento estatístico**

Os dados foram analisados segundo o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2 x 2 x 4) + 6, sendo dois explantes (ápice caulinar e nó cotiledonar), duas condições (com e sem pré-cultivo por 24 horas), quatro tempos de dessecação (0, 3, 6, e 9 horas) e seis testemunhas adicionais referentes ao comportamento dos explantes nas diferentes etapas do encapsulamento. Procedeu-se análise de variância dos dados obtidos, com comparações de média dos explantes estudados, realizada pelo teste de Tukey a 5%, e desdobramento da variável quantitativa em parâmetros de regressão polinomial.

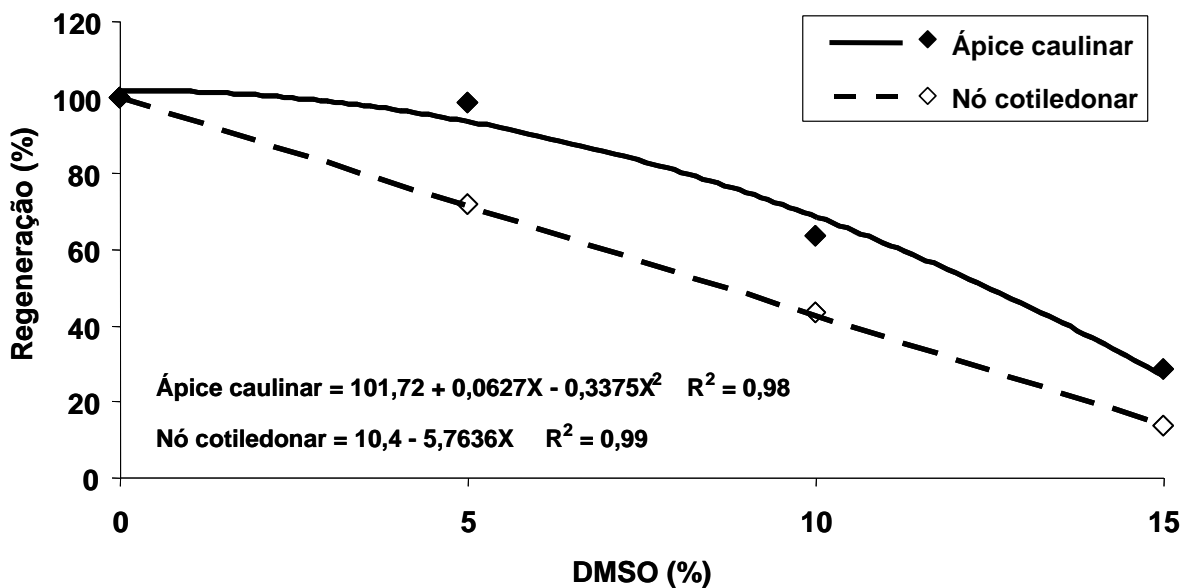
## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Método da vitrificação**

A análise de variância dos dados de regeneração, número e comprimento de brotos, encontram-se no Apêndice 1A, observando-se que a interação tripla (explante x dimetilsulfóxido x sacarose), só foi significativa para os dados de comprimento de brotos. Por sua vez, a única interação dupla significativa foi (explante x dimetilsulfóxido), em todas as avaliações realizadas. Já a sacarose foi a única variável que não surtiu qualquer efeito significativo nas avaliações realizadas, indicando que as concentrações desse componente, empregadas no

presente estudo não alteram o metabolismo das células. Segundo Dumet *et al.* (1994) os açúcares, como a sacarose, são usados como substâncias crioprotetoras por se constituírem em ótimos agentes vitrificantes, além de não apresentarem citotoxicidade, mesmo quando acumulados em grande quantidade no citoplasma.

Na Figura 3, encontra-se a regeneração, em porcentagem, dos explantes de algodoeiro diante do pré-cultivo com o crioprotetor químico DMSO. O explante ápice caulinar não sofreu alteração na sua regeneração quando se empregou o DMSO em concentração inferior a 5% no meio MS líquido, apresentando regeneração superior a 98% nessas condições (Figura 3 e Tabelas 1); no entanto, ocorreram reduções na regeneração dos ápices caulinares, com valores na ordem de 63 e 28%, após pré-cultivo, com concentrações de 10 e 15% do DMSO, respectivamente, enquanto o explante nó cotiledonar sofreu ainda mais o efeito do DMSO, reduzindo consideravelmente sua regeneração a medida em que foi submetido ao pré-cultivo com o crioprotetor químico (Figura 3 e Tabela 1). O comportamento da regeneração dos explantes após o tratamento com o DMSO demonstra a susceptibilidade dos mesmos à concentrações elevadas daquele crioprotetor, afetando sua viabilidade, sendo portanto, de grande importância o estudo da viabilidade dos explantes após tratamento em menores concentrações. Em comunhão com os resultados obtidos, diversos trabalhos, empregando o cultivo de células vegetais, tem indicado que o ótimo de concentração do DMSO como crioprotetor situa-se entre 5 a 8% (SAKAI e SUGAWARA, 1978) porém padrões de 5 a 15% (KARTHA *et al.*, 1979; UMEMURA e SAKAI, 1980) parecem refletir as diferentes taxas de penetração do DMSO em ápices de várias espécies.



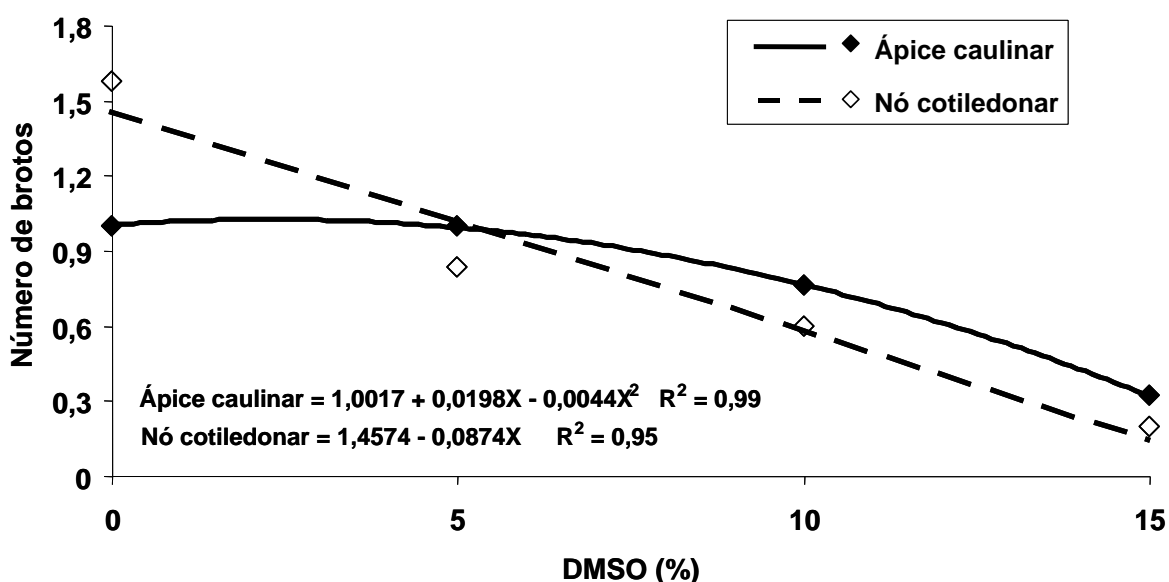
**Figura 3.** Regeneração de explantes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) cultivados *in vitro*, em função da concentração do dimetilsulfóxido (DMSO), usado como crioprotetor.

**Tabela 1.** Valores médios de regeneração, número e comprimento de brotos emitidos por explantes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) pré-cultivados com dimetilsulfóxido (DMSO) durante 48 horas.

	DMSO (%)			
	Regeneração (%)			
	0	5	10	15
Ápice caulinar	100,00 a	98,75 a	63,44 a	28,44 a
Nó cotiledonar	100,00 a	71,87 b	49,37 b	13,44 b
DMS = 3,57				
	Número de brotos			
	0	5	10	15
Ápice caulinar	1,00 b	0,99 a	0,76 a	0,32 a
Nó cotiledonar	1,57 a	0,83 b	0,60 b	0,19 b
DMS = 0,03				
	Comprimento de brotos (cm)			
	0	5	10	15
Ápice caulinar	1,11 a	1,07 a	0,75 a	0,23 a
Nó cotiledonar	0,85 b	0,49 b	0,39 b	0,16 a
DMS = 0,06				

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

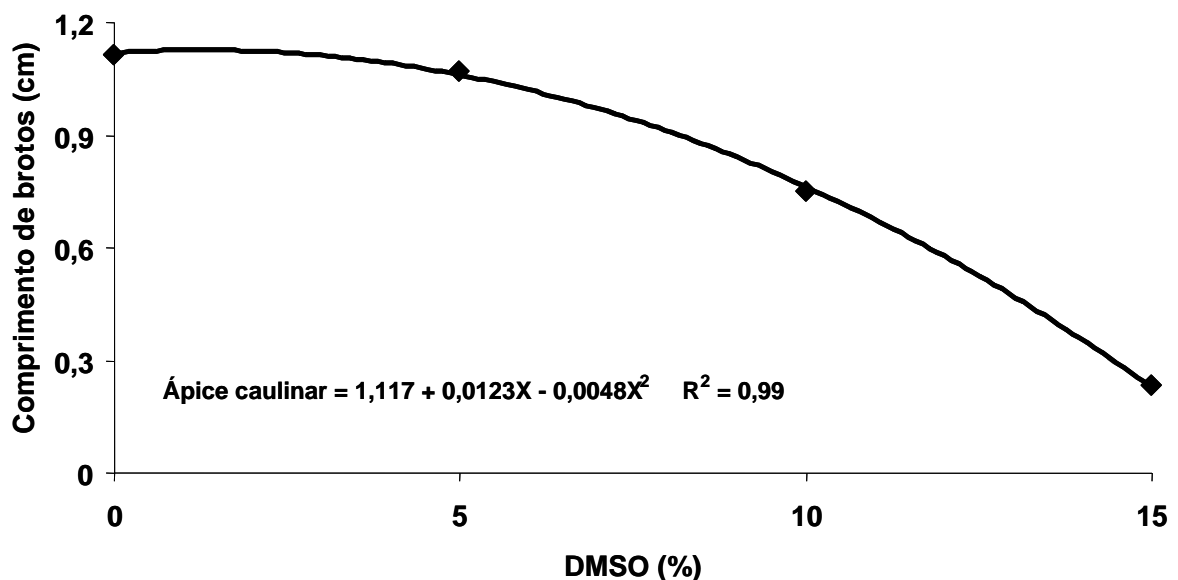
Quanto ao número de brotos (Tabela 1), o explante ápice caulinar tolerou o pré-cultivo com DMSO a 5%, sem alterações significativas na emissão de brotos, com máxima eficiência em concentrações de 2,25% do DMSO (Figura 4). Concentrações superiores a 5% do crioprotetor químico tenderam a provocar a redução na emissão de brotos dos ápices caulinares. Os nós cotiledonares, por sua natureza, apresentam duas gemas laterais, o que lhes atribui, inicialmente, maior número de brotos por explante; contudo, este explante parece sofrer mais o efeito do crioprotetor químico DMSO, reduzindo a emissão de brotos com o aumento de sua concentração na solução (Figura 4 e Tabela 1). Em contraste aos resultados obtidos, estudos realizados empregando o DMSO a 10%, isolado ou associado a outros crioprotetores, garantiram elevada sobrevivência de ápices de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) (UEMURA e SAKAI, 1980) e meristemas apicais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) criopreservados (BAJA, 1977). Escobar *et al.* (2000a) afirmam que a sacarose e o DMSO, quando empregados em altas concentrações em ápices de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) elevam a pressão osmótica de suas células, alterando suas respostas morfogênicas, causando a formação de calos.



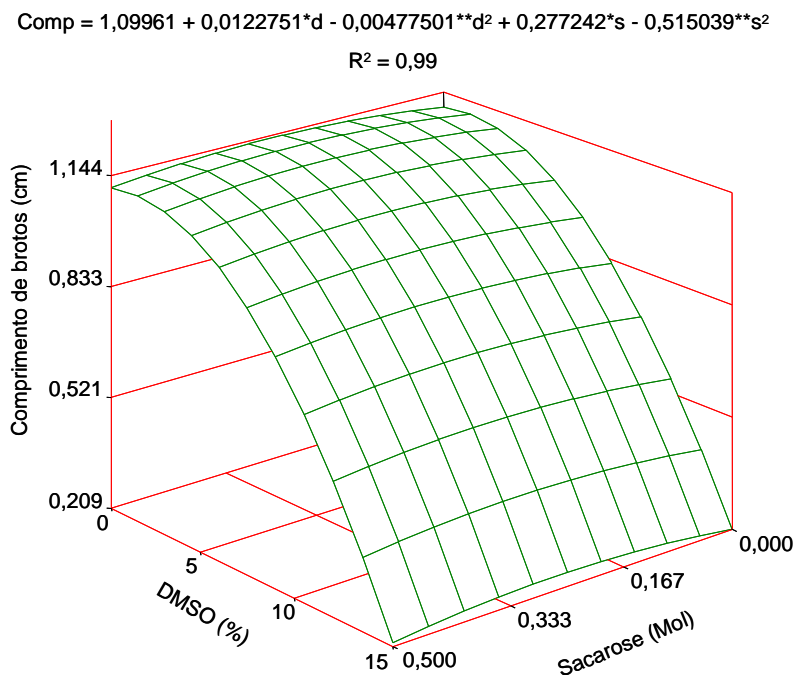
**Figura 4.** Número de brotos emitidos por explantes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) cultivados *in vitro*, em função da concentração do dimetilsulfóxido (DMSO), usado como crioprotetor.

O comprimento de brotos emitidos por ápices caulinares também sofreu influência do pré-cultivo com DMSO em concentrações superiores a 5% (Figura 5

e Tabela 1). O comprimento de brotos emitidos pelo explante nó cotiledonar foi influenciado no pré-cultivo pelo DMSO e pela sacarose. O ponto de máxima eficiência no comprimento de brotos, estimado pela regressão, foi obtido em meio MS líquido acrescido de 0,27 M de sacarose e 1,3% de DMSO, após 48 horas de cultivo (Figura 6). Mais uma vez, a concentração do DMSO acima de 5% no meio de pré-cultivo, afetou negativamente o explante nó cotiledonar, reduzindo o comprimento dos brotos emitidos. Os resultados obtidos concordam com Nash (1966) onde ápices de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) submetidos ao DMSO, usado isoladamente ou em combinação com glicose, sacarose ou sorbitol, foi suficientemente efetivo, contudo, quando dissolvido em meio de cultura MS com sacarose foi menos efetivo. Isto pode ser devido ao fato do meio de cultura MS causar um aumento excessivo na concentração de eletrólitos durante o congelamento e, o DMSO produzir crioproteção, prevenindo o aumento excessivo dos eletrólitos. Kartha (1985) e Sakai (1995) reafirmam que o emprego de crioprotetores químicos, a exemplo do DMSO, podem causar citotoxicidade e estresses osmóticos, levando à morte das células ou modificando sua resposta morfogênética em cultura.



**Figura 5.** Comprimento de brotos emitidos por ápices caulinares de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) cultivados *in vitro*, em função da concentração do dimetilsulfóxido (DMSO), usado como crioprotetor.



**Figura 6.** Comprimento de brotos emitidos por nós cotiledonares de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) cultivados *in vitro*, em função da concentração do dimetilsulfóxido (DMSO) e sacarose, usados como crioprotetor.

Os resultados apresentados evidenciam que ápices caulinares e nós cotiledonares de algodoeiro não toleram concentrações elevadas do DMSO. Um outro ponto a se considerar é o tempo de permanência dos explantes no pré-cultivo com o crioprotetor químico. Wu *et al.* (2000) avaliando um protocolo para a criopreservação de suspensões celulares de morango, verificaram efeito do período de pré-cultivo em várias condições de sacarose e DMSO, alterando a viabilidade das células, antes e após a criopreservação.

Quando os explantes pré-cultivados nas diferentes concentrações do DMSO e sacarose foram submetidos a criopreservação, por sua imersão direta em nitrogênio líquido (-196°C) e então cultivados *in vitro*, não apresentaram nenhum sinal de viabilidade, independente da forma de descongelamento a que foram submetidos (Tabela 2); os explantes apresentavam-se escuros, com sinais evidentes de danos causados pelo congelamento. De forma semelhante ao que foi obtido Shatnawi *et al.* (2000), crioconservando ápices de uma espécie do gênero *Prunus*, verificaram que a sobrevivência após vitrificação com PVS2 (30% de glicerol + 15% de polietileno glicol + 15% de DMSO + 0,4 M de sacarose em

meio MS) não apresentou bons resultados. Nishiwaza *et al.* (1992) afirmam que alterações no período de pré-cultivo dos explantes na solução de vitrificação podem resultar em diferentes respostas e garantir melhores taxas de sobrevivência após criopreservação, mas Sudarmonowati *et al.* (2000) verificaram que ápices caulinares de *Acacia mangium* pré-cultivados por diferentes períodos em meio com elevada concentração de sacarose, alteraram a regeneração dos ápices antes da criopreservação; contudo, não sobreviveram quando submetidos às condições do nitrogênio líquido.

**Tabela 2.** Efeito do protocolo de vitrificação na regeneração de ápices caulinares e nós cotiledonares de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) antes (-NL) e após (+NL) criopreservação, empregando-se o descongelamento pelo mergulho dos criotubos em água à 38±2°C por 1-2 minutos (banho maria) e sob condições de ambiente à 25±2°C por 60 minutos (ambiente).

Crioprotetor		Regeneração (%)					
DMSO (%)	Sacarose (M)	- NL		+ NL			
		Ápice	Nó	Banho maria		Ambiente	
				Ápice	Nó	Ápice	Nó
0	0	100	100	0	0	0	0
0	0,10	100	100	0	0	0	0
0	0,25	100	100	0	0	0	0
0	0,50	100	100	0	0	0	0
5	0	100	75	0	0	0	0
5	0,10	100	70	0	0	0	0
5	0,25	97	75	0	0	0	0
5	0,50	97	67	0	0	0	0
10	0	67	50	0	0	0	0
10	0,10	63	50	0	0	0	0
10	0,25	60	50	0	0	0	0
10	0,50	62	47	0	0	0	0
15	0	30	16	0	0	0	0
15	0,10	28	12	0	0	0	0
15	0,25	27	12	0	0	0	0
15	0,50	27	12	0	0	0	0

## 5.2 Método do encapsulamento-dessecação

O teor de água dos explantes de algodoeiro encapsulados em bolhas de alginato de sódio encontra-se na Tabela 3. Os ápices caulinares encapsulados, mas não pré-cultivados em meio MS líquido com 0,3 M de sacarose, continham um teor de água médio, em torno de 82%, com base no peso fresco, antes da dessecação, enquanto os pré-cultivados apresentaram menor conteúdo de água (em torno de 68%) devido, provavelmente, a parte da água livre contida nas células, ter sido removida por meio da desidratação osmótica, causada pela concentração de sacarose presente no meio de pré-cultivo. O mesmo foi constatado com nós cotiledonares encapsulados com pré-cultivo em relação aos não pré-cultivados. Constatou-se diminuição semelhante no teor de água em virtude do pré-tratamento com sacarose em outros estudos semelhantes (FABRE e DEREUDDRE, 1990; PANIS *et al.* 1996; SANTOS e STUSHNOFF, 2002). Quando os explantes encapsulados foram submetidos a dessecação, ocorreu elevada perda de água nas três primeiras horas de permanência na câmara de fluxo laminar atingindo, ao final do tempo máximo de dessecação (9 horas), teor de 13 e 10% e de 10 e 11%, para os explantes ápice caulinar e nó cotiledonar sem pré-cultivo e pré-cultivados em sacarose, respectivamente (Tabela 3).

**Tabela 3.** Teor de água de explantes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) encapsulados com e sem pré-cultivo em meio MS líquido com 0,3 M de sacarose por 24 horas e submetidos a dessecação em câmara de fluxo laminar.

Teor de água (%)				
Dessecação (horas)	Ápice caulinar		Nó cotiledonar	
	Sem pré-cultivo	Com pré-cultivo	Sem pré-cultivo	Com pré-cultivo
0	82	68	76	57
3	38	26	32	25
6	20	16	18	14
9	13	10	10	11

A análise de variância dos dados de regeneração, número e comprimento de brotos emitidos de explantes de algodoeiro encapsulados (Apêndice 1B) só detectou efeito significativo para as interações duplas entre (explante x dessecação) para os dados de regeneração e número de brotos, e entre pré-cultivo x dessecação, para o comprimento de brotos. O pré-cultivo em meio MS líquido com 0,3 M de sacarose, por sua vez, foi a única fonte de variação que, isoladamente, não exerceu influência significativa no comprimento de brotos. O



emprego do pré-cultivo com sacarose é relatado em diversos estudos, com o objetivo de tornar a estrutura a ser criopreservada mais resistente aos danos causados pelo congelamento (FABRE e DEREUDDRE, 1990; HANSAN e TAKAGI, 1995; PANIS *et al.*, 1996; SANTOS e STUSHNOFF, 2002).

O efeito de cada procedimento nas diferentes etapas do processo de encapsulamento dos explantes, sobre sua regeneração, número e comprimento de brotos emitidos, encontra-se na Tabela 4; observa-se que o procedimento de encapsulamento interferiu nas demais avaliações realizadas nos explantes, cultivados *in vitro*, apresentando, em média, valores inferiores, quando comparado com ápice caulinar sem qualquer tratamento e quando encapsulados, com ou sem pré-cultivo por 24 horas, em meio MS líquido com 0,3 M de sacarose (Tabela 4). O mesmo se verificou em relação aos valores de regeneração e número de brotos emitidos de nós cotiledonares não submetidos a qualquer tratamento. Comportamento semelhante no encapsulamento foi constatado por Hasan e Takagi (1995) com segmentos nodais de inhame (*Dioscorea* spp.) e González-Benito e Pérez (1997) com explantes nodais de *Centaureum rigualli*, relatando que, quando não removidos das bolhas no cultivo, explantes podem sofrer influência da sacarose contida nas bolhas, afetando sua sobrevivência. Contudo, González-Benito e Pérez (1997) afirmaram que a concentração de sacarose nas bolhas não exerce nenhuma influência na sobrevivência ou viabilidade de nós encapsulados de *Centaureum rigualli*, provavelmente devido a difusão da sacarose para o meio de cultura. Do ponto de vista da conservação de germoplasma, o atraso observado nos explantes encapsulados pode favorecer o procedimento de troca e/ou envio de germoplasma para regiões distintas, condição que exige um mínimo de atividade metabólica do material a ser transportado.

**Tabela 4.** Valores médios de regeneração, número e comprimento de brotos emitidos de explantes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) submetidos as diferentes etapas do processo de encapsulamento, empregados como testemunhas adicionais.

<b>Regeneração</b>		
	Ápice caulinar	Nó cotiledonar
Encapsulamento	78,75 b	78,75 b
Explante sem tratamento	100,00 a	100,00 a
Encapsulamento	78,75 b	78,75 a
Encapsulamento sem pré-cultivo	100,00 a	70,00 a
Encapsulamento	78,75 b	78,75 a
Encapsulamento com pré-cultivo	100,00 a	80,00 a
<b>Número de brotos</b>		
	Ápice caulinar	Nó cotiledonar
Encapsulamento	0,75 b	0,75 b
Explante sem tratamento	1,00 a	1,64 a
Encapsulamento	0,75 b	0,75 a
Encapsulamento sem pré-cultivo	1,00 a	0,70 a
Encapsulamento	0,75 b	0,75 a
Encapsulamento com pré-cultivo	1,00 a	0,85 a
<b>Comprimento de brotos</b>		
	Ápice caulinar	Nó cotiledonar
Encapsulamento	0,97 b	0,97 a
Explante sem tratamento	1,15 a	0,90 a
Encapsulamento	0,97 b	0,97 a
Encapsulamento sem pré-cultivo	2,04 a	0,77 a
Encapsulamento	0,97 b	0,97 a
Encapsulamento com pré-cultivo	1,97 a	0,91 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Encontram-se, na Tabela 5, a regeneração e o número de brotos emitidos por explantes de algodoeiro encapsulados com alginato de sódio e dessecados em câmara de fluxo laminar, com destaque para o explante ápice caulinar, que apresentou valores superiores ao nó cotiledonar, independente do tempo em que permaneceram em dessecação. Alguns autores também obtiveram resultados semelhantes a esses com embriões somáticos (DEREUIDRE *et al.*, 1991a) e explantes vegetativos (SCOTTEZ *et al.*, 1992; PAULET *et al.*, 1993). O procedimento de dessecação tem, por finalidade, reduzir o teor de água dos explantes encapsulados; contudo, Choy Ng e Quat Ng (2000) esclareceram que a tolerância a dessecação depende do explante empregado.

**Tabela 5.** Valores médios de regeneração e número de brotos emitidos por explantes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) submetidos ao processo de encapsulamento-dessecação.

<b>Tempo de dessecação (horas)</b>				
<b>Regeneração (%)</b>				
	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>9</b>
Ápice caulinar	97,00 a	90,00 a	77,50 a	45,00 a
Nó cotiledonar	60,00 b	32,50 b	12,50 b	2,50 b
DMS = 8,57				
<b>Número de brotos</b>				
	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>9</b>
Ápice caulinar	0,90 a	0,90 a	0,77 a	0,45 a
Nó cotiledonar	0,60 b	0,32 b	0,12 b	0,02 b
DMS = 0,10				

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A Tabela 6 apresenta os valores de comprimento de brotos emitidos de explantes encapsulados e dessecados na câmara de fluxo laminar em função da realização do seu pré-cultivo durante 24 horas, em meio MS líquido, com 0,3 M de sacarose. Nota-se que até três horas de dessecação não ocorreram diferenças significativas no comprimento de brotos emitidos por explantes encapsulados com ou sem pré-cultivo; no entanto, quando os mesmos permaneceram em dessecação por mais de seis horas, o pré-cultivo garantiu, aos explantes, valores superiores no comprimento dos brotos emitidos; cujos dados concordam com os obtidos por Scottez *et al.*, (1992) e Paulet *et al.*, (1993) crioconservando ápices de pereira (*Pirus* spp.) e de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) por meio da técnica de encapsulamento-dessecação. Segundo Koster (1991) a sacarose pode provocar a vitrificação da solução celular sob temperatura ambiente e influenciar na habilidade para evitar danos devido a dessecação.

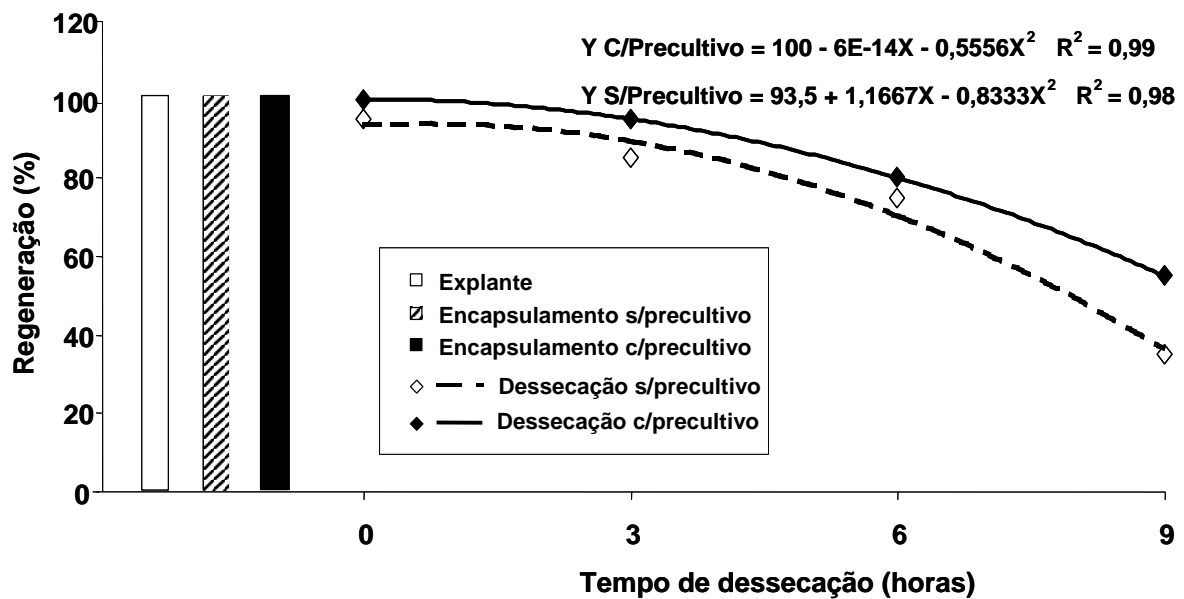
**Tabela 6.** Valores médios de comprimento de brotos emitidos de explantes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) submetidos ao processo de encapsulamento-dessecação, com ou sem pré-cultivo, por 24 horas, em meio MS líquido com 0,3 M de sacarose.

	Tempo de dessecação (horas)			
	Comprimento de brotos (cm)			
	0	3	6	9
Com pré-cultivo	0,90 a	0,88 a	1,08 a	0,48 a
Sem pré-cultivo	1,04 a	0,80 a	0,54 b	0,29 b

DMS = 0,14

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

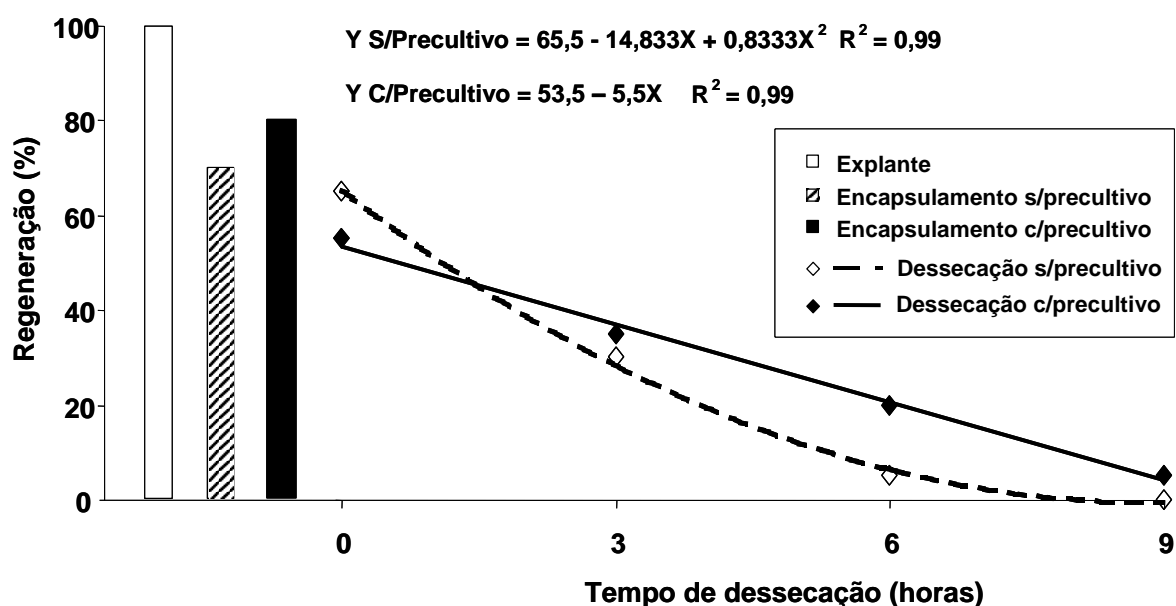
Em si, o procedimento de encapsulamento parece não ter afetado a capacidade regenerativa do ápice caulinar, independente da realização do pré-cultivo por 24 horas em meio MS líquido, com 0,3 M de sacarose, de acordo com testemunhas indicadas por barras na Figura 7, representando o explante sem qualquer tratamento, bem como o explante encapsulado com e sem pré-cultivo, comparados ao tempo zero de dessecação dos explantes encapsulados; mas, o procedimento de dessecação do ápice caulinar encapsulado reduziu sua capacidade regenerativa, em função do tempo que permaneceram dessecando na câmara de fluxo laminar, independente de ter sido pré-cultivados ou não, apesar de se constatar, em valores absolutos, maior regeneração dos ápices que foram pré-cultivados (Figura 7). As maiores reduções na regeneração ocorreram após dessecação, por período de permanência na câmara de fluxo laminar superior a seis horas, quando ápices encapsulados com e sem pré-cultivo, continham em torno de 16 e 20% do teor de água, respectivamente (Tabela 3). Minami e Sawai (2000) trabalhando com encapsulamento-dessecação de ápices de *Zoysia japonica* Steud., encontraram que o ótimo de sobrevivência foi alcançado quando bolhas foram dessecadas para um conteúdo de água de 15-25% e que o período de dessecação varia em função da concentração de sacarose no meio de pré-cultivo, porém, Santos e Stushnoff (2002), afirmam que o nível de sacarose no meio de pré-cultivo, assim como a duração da exposição do explante no meio, não influencia a recuperação após dessecação.



**Figura 7.** Porcentagem de regeneração *in vitro* de ápices caulinares de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), submetidos ao processo de encapsulamento-dessecação.

No que diz respeito à regeneração do explante nó cotiledonar (Figura 8), o procedimento de encapsulamento dos mesmos com alginato de sódio parece interferir na sua capacidade regenerativa, de acordo com testemunhas apresentadas na Figura 8, sendo visualmente maior a redução quando os explantes foram encapsulados sem pré-cultivo em meio MS líquido com 0,3 M de sacarose, durante 24 horas. Estes dados parecem se correlacionar com os da Tabela 3, referente ao teor de água, onde explantes pré-cultivados apresentaram valores inferiores aos não pré-cultivados. Redução semelhante no teor de água foi observado em explantes encapsulados que foram inicialmente submetidos a desidratação osmótica (FABRE e DEREUDDRE, 1990; PANIS *et al.*, 1996; SANTOS e STUSHNOFF, 2002). Quando os nós cotiledonares encapsulados foram então submetidos a dessecação, a redução na regeneração foi ainda mais acentuada, atingindo, após seis horas de permanência na câmara de fluxo laminar, valores inferiores a 30%, independente do pré-cultivo. Os resultados obtidos indicam que a dessecação é um fator limitante, e que apenas o procedimento de encapsulamento não garante tolerância à dessecação aos explantes de algodoeiro, estando de acordo com os dados obtidos por Santos e Stushnoff, (2002). Choy Ng e Quat Ng (2000) avaliando o procedimento de vitrificação de ápices e explantes nodais de mandioca (*Manihot esculenta*),

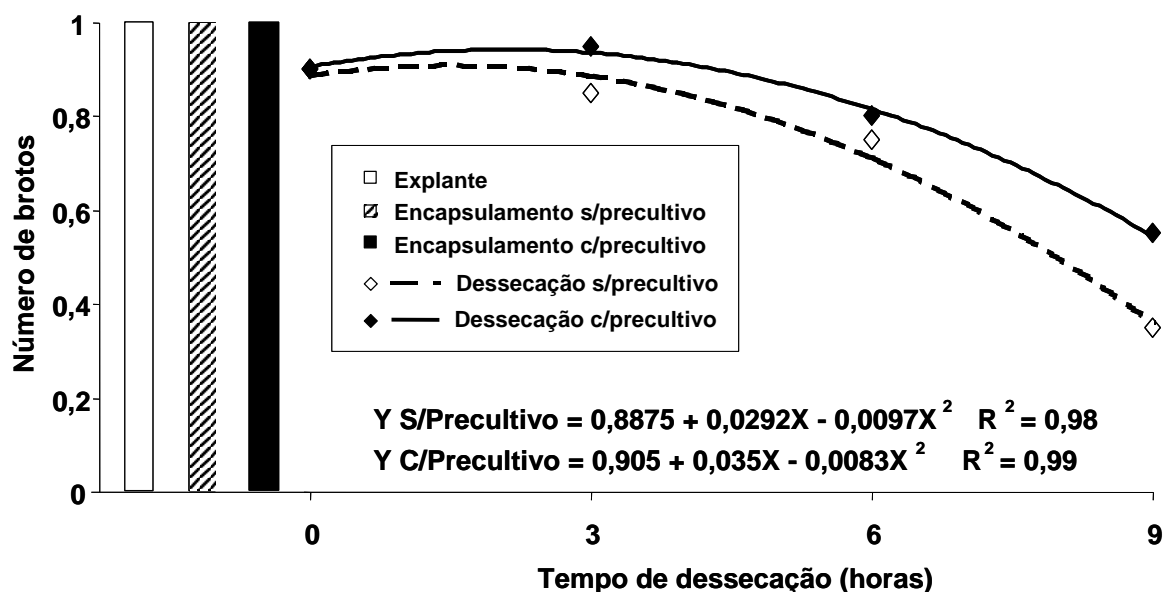
afirmam que, em geral, os ápices caulinares são mais resistentes do que os explantes nodais.



**Figura 8.** Porcentagem de regeneração *in vitro* de nós cotiledonares de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), submetidos ao processo de encapsulamento-dessecação.

O número de brotos emitidos por ápices caulinares não variou em função do processo de encapsulamento, de acordo com testemunhas apresentadas em barras na Figura 9. Durante dessecação dos explantes encapsulados observou-se variação na emissão de brotos, em função do tempo de dessecação, em que ápices caulinares que foram pré-cultivados por 24 horas em meio MS líquido com 0,3 M de sacarose apresentaram, em geral, os maiores valores, com a máxima eficiência estimada em torno de duas horas de dessecação, enquanto a máxima emissão de brotos dos ápices encapsulados, mas não pré-cultivados, é alcançada após 1,5 horas de dessecação. A dessecação dos ápices encapsulados por tempo superior a três horas, parece afetar a emissão de brotos, independente do pré-cultivo (Figura 9). O comportamento verificado no presente estudo pode ser explicado pelo verificado por diversos autores que, relacionam a concentração de sacarose no meio de pré-cultivo e a duração do período de dessecação na melhor resposta dos explantes, recomendando o uso de meios seqüenciados, com elevação na concentração de sacarose e variação na duração do tratamento

(HASKINS *et al.*, 1980; KARTHA *et al.*, 1980; TOWILL, 1984; ESCOBAR *et al.*, 1995; ESCOBAR *et al.*, 2000b; WU *et al.*, 2001).

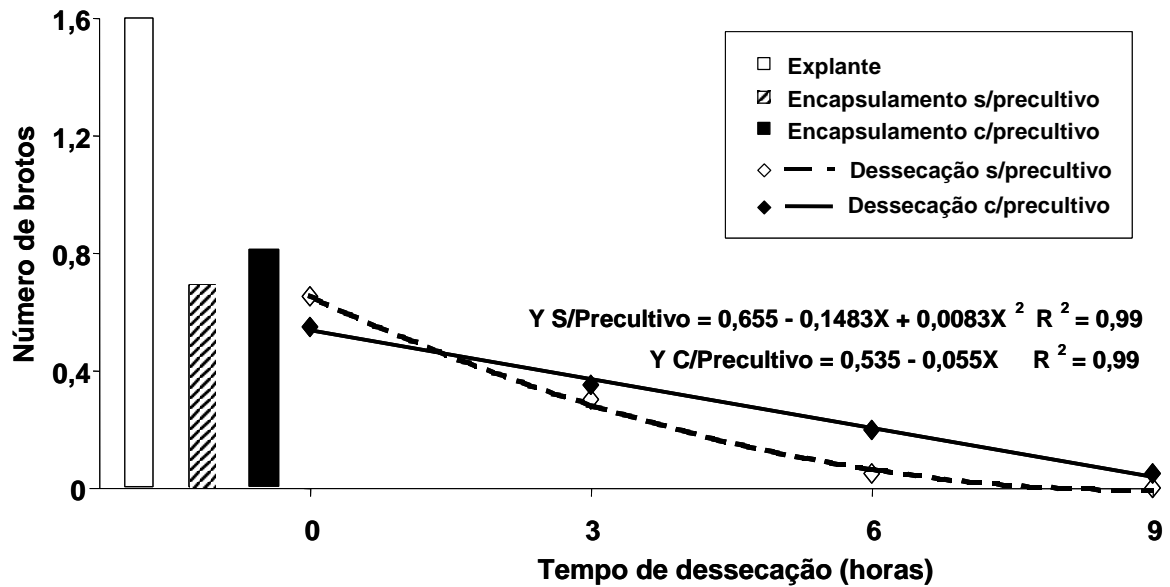


**Figura 9.** Número de brotos emitidos por ápices caulinares de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), submetidos ao processo de encapsulamento-dessecação.

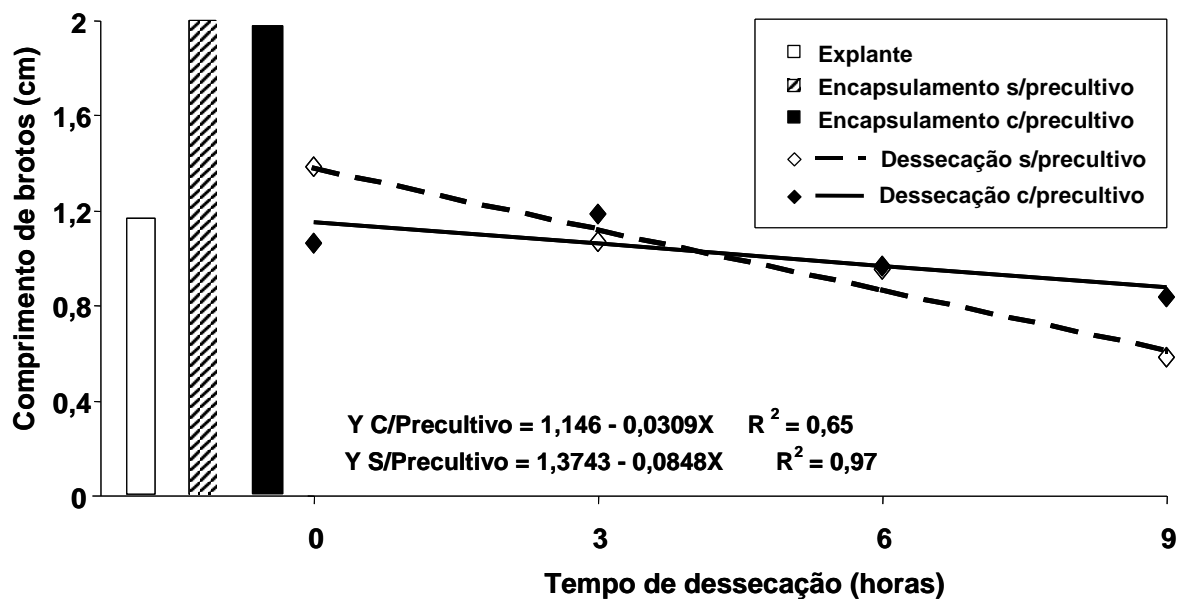
Quando encapsulado, o nó cotiledonar reduziu, à metade, a emissão de seus brotos, quando comparado ao seu cultivo sem encapsulamento (Figura 10), sendo a redução ainda mais pronunciada quando submetidos a dessecação, não fazendo diferença a realização de cultivo por 24 horas em meio MS líquido com 0,3 M de sacarose, prévio ao encapsulamento.

Apesar do ápice caulinar encapsulado não variar quanto à sua regeneração e emissão de brotos, quando comparado ao seu cultivo sem qualquer tratamento (Figuras 7 e 9) o comprimento dos brotos emitidos por ápices encapsulados com ou sem pré-cultivo, parece ser superior ao dos não encapsulados (Figura 11), o que pode ter sido favorecido pela quantidade de nutrientes minerais e hormonais presentes no próprio encapsulamento, contribuindo para o melhor desempenho dos explantes regenerados. Comportamento semelhante foi verificado por Fabre e Dereuddre (1990). Explantes encapsulados e submetidos a dessecação, tiveram o comprimento de seus brotos afetado em função do tempo de dessecação, sendo tal comportamento mais pronunciado quando não pré-cultivados (Figuras 11 e 12).

Matsumoto *et al.* (1995), relatam que a adição de glicerol junto à sacarose no meio de pré-cultivo, foi mais efetivo que apenas a sacarose na obtenção de elevadas taxas de regeneração dos explantes de lírio, submetidos a encapsulamento-dessecação.



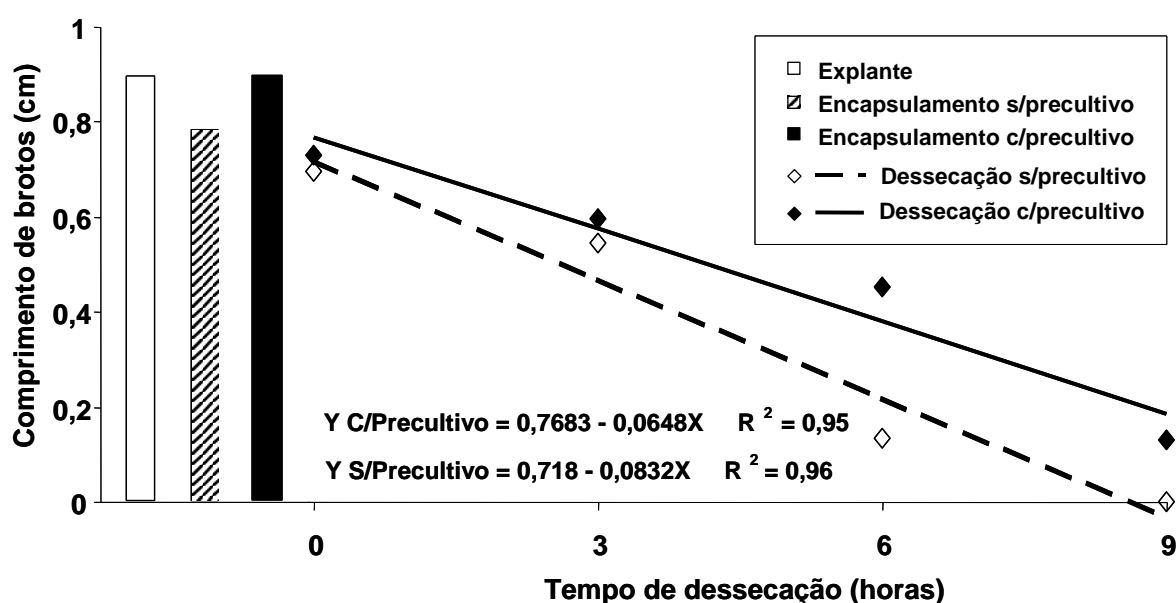
**Figura 10.** Número de brotos emitidos por nós cotiledonares de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), submetidos ao processo de encapsulamento-dessecação.





**Figura 11.** Comprimento de brotos emitidos por ápices caulinares de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), submetidos ao processo de encapsulamento-dessecação.

Na Figura 12, o comprimento de brotos emitidos por nós cotiledonares encapsulados tendeu a se reduzir a medida em que se aumentou o tempo de permanência sob dessecação na câmara de fluxo laminar, o que evidencia correlação direta com a redução no conteúdo de água daqueles explantes e sua tolerância a dessecação (Tabela 3). O procedimento de encapsulamento parece não afetar o comprimento de brotos, apresentando melhores resultados quando pré-cultivados em sacarose. Estes resultados concordam com Paulet *et al.* (1993), avaliando o procedimento de encapsulamento-dessecação de meristemas de cana-de-açúcar, relatam que o encapsulamento não afetou a regeneração, mas apenas induziu uma redução no desenvolvimento, quando comparado àqueles que haviam sido extraídos da bolha de alginato.



**Figura 12.** Comprimento de brotos emitidos por nós cotiledonares de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), submetidos ao processo de encapsulamento-dessecação.

Ápices caulinares e nós cotiledonares de algodoeiro encapsulados com alginato de sódio, com ou sem pré-cultivo em meio MS, com 0,3 M de sacarose e

dessecados por diferentes períodos na câmara de fluxo laminar, não sobreviveram à temperatura do nitrogênio líquido (-196°C), independente da forma de descongelamento empregada (Tabelas 7 e 8), apresentando-se de tonalidade escura, com sinais evidentes de danos causados pelo congelamento. Matsumoto *et al.* (1995) estudando a criopreservação de meristemas apicais de *Wasabia japonica* pelo método de encapsulamento-dessecação, não obtiveram sobrevivência alguma após imersão em nitrogênio líquido quando não pré-cultivados em 0,3 M de sacarose. Bachiri *et al.* (2001), avaliando a criopreservação de germoplasma de kiwi (*Actinidia* spp.) pelo método do encapsulamento-dessecação, afirmam que a recuperação após criopreservação só foi alcançada após aumento gradativo da concentração de sacarose no meio de pré e pós-cultivo com variação no tempo de cultivo, enfatizando a importância do monitoramento do balanço dos reguladores de crescimento vegetal, principalmente na recuperação após descongelamento; já Hornung *et al.* (2001) afirmam que o pré-cultivo com meio líquido contendo sacarose e manitol foi essencial para a recuperação após descongelamento de ápices encapsulados de orelha de madeira (*Auricula* spp.).

Segundo Dereuddre *et al.* (1991b) a técnica de encapsulamento-dessecação tem, como vantagem, a possibilidade de realização do congelamento rápido por meio da imersão direta do material no nitrogênio líquido, evitando o uso de dispositivos caros ou complicados para controlar a velocidade de congelamento, porém para algumas espécies, como a batata doce (*Ipomea batatas*), o congelamento lento é mais efetivo (BLAKESLEY *et al.*, 1995). Shibli e Al-Juboory (2000) destacam que o emprego da técnica de encapsulamento-vitrificação, empregando-se o PVS2 como crioprotetor, foi mais eficiente na regeneração de embriões zigóticos de oliva (*Olea europea* L.) após criopreservação, que o encapsulamento-dessecação. Diante disto, fica claro que são inúmeros os fatores que determinam a sobrevivência de explantes vegetais submetidos à criopreservação, dentre os quais se destacam o tipo de crioprotetor, as técnicas de pré-congelamento e a velocidade de resfriamento e/ou descongelamento.

**Tabela 7.** Efeito do encapsulamento sem pré-cultivo (MS + 0,3 M sacarose) de explantes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) submetidos a dessecação, sobre sua regeneração antes (-NL) e após (+NL) criopreservação, empregando o descongelamento pelo mergulho dos criotubos em água à 38±2°C por 1-2 minutos (banho maria) e sob condições de ambiente à 25±2°C por 60 minutos (ambiente).

Regeneração (%)						
Dessecação (horas)	Ápice caulinar			Nó cotiledonar		
	-NL	+NL		-NL	+NL	
		Banho maria	ambiente		Banho maria	ambiente
0	95	0	0	65	0	0
3	85	0	0	30	0	0
6	75	0	0	5	0	0
9	35	0	0	0	0	0

**Tabela 8.** Efeito do encapsulamento com pré-cultivo (MS + 0,3 M sacarose) de explantes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) submetidos a dessecação, sobre sua regeneração antes (-NL) e após (+NL) criopreservação, empregando o descongelamento pelo mergulho dos criotubos em água à 38±2°C por 1-2 minutos (banho maria) e sob condições de ambiente à 25±2°C por 60 minutos (ambiente).

Regeneração (%)						
Dessecação (horas)	Ápice caulinar			Nó cotiledonar		
	-NL	+NL		-NL	+NL	
		Banho maria	ambiente		Banho maria	Ambiente
0	100	0	0	55	0	0
3	95	0	0	35	0	0
6	80	0	0	20	0	0
9	55	0	0	5	0	0

## 6 CONCLUSÕES

A viabilidade dos explantes ápices caulinares e nós cotiledonares, de algodoeiro não é afetada pelo emprego da sacarose como crioprotetor nas concentrações estudadas (0,10; 0,25 e 0,50 M);

O pré-cultivo dos explantes ápices caulinares e nós cotiledonares de algodoeiro durante 48 horas em meio MS líquido contendo dimetilsulfóxido, em concentração superior a 5%, afeta a viabilidade dos mesmos, quer isolado ou associado a sacarose nas concentrações estudadas (0,10; 0,25 e 0,50M);

O método de vitrificação de ápices caulinares e nós cotiledonares de algodoeiro pré-cultivados com sacarose (0; 0,10; 0,25 e 0,50 M) e/ou dimetilsulfóxido (0; 5; 10 e 15%), não garantiu regeneração ou qualquer atividade metabólica após imersão direta no nitrogênio líquido (-196°C) e descongelamento

em banho maria ( $38\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 1-2 minutos) ou sob condições de ambiente ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos);

Nós cotiledonares e ápices caulinares encapsulados com alginato de sódio não toleram dessecação em câmara de fluxo laminar ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) por período superior a três e seis horas, respectivamente e, não apresentaram atividade metabólica *in vitro*, quando imersos em nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) e descongelados por imersão em água ( $38\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 1-2 minutos) ou a temperatura ambiente ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos).;

O pré-cultivo dos explantes em MS líquido com 0,3 M de sacarose garantiu menor conteúdo de água em suas células após encapsulamento;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACHIRI, Y.; SONG, G.Q.; PLESSIS, P.; SHOAR-GHAFFARI, A.; REKAB, T.; MORISSET, C. Routine cryopreservation of kiwifruit (*Actinidia* spp.) germplasm by encapsulation-dehydration: importance of plant growth regulators. **Cryo-Letters**, v.22, p.61-74, 2001.

BAJAJ, Y.P.S. Clonal multiplication and cryopreservation of cassava through tissue culture. **Crop Improvement** v.4, p.198-204, 1977.

BERJAK, P.; WALKER, M.; MYCOCK, D.J.; WESLEY-SMITH, J.; WATT, P.; PAMMENTER, N.W. Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Japan/International; Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p.140-155.

BLAKESLEY, D.; AL-MAZROOEIS, S.; HENSHAW, G.G. Cryopreservation of embryogenic tissue of sweet potato (*Ipomea batatas*): use for sucrose and dehydration for cryoprotection. **Plant Cell Reports**, v.15, p.259-263, 1995.

CHOY NG, S.Y.; QUAT NG, N. Cryopreservation of cassava and yam shoot-tips by fast freezing. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. **Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research progress and application**, Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences,

Japan/International; Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p.418-420.

CID, L.P.B. Sementes sintéticas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.7, n.32, p.4-7, 2004.

DEREUDRE, J.; BLANDIN, S.; HASSEN, N. Resistance of alginated-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, 1991a.

DEREUDRE, J.; HASSEN, N.; BLANDIN, S. KAMINSKI, M. Resistance of alginated-coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to desiccation and freezing in liquid nitrogen: 2 Thermal analysis. **Cryo-Letters**, v.12, p.135-148, 1991b.

DUMET, D.; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUSSERT, S.; DUVAL, Y. Effects of various sugars and polyols on the tolerance to desiccation and freezing of oil plum polyembryonic cultures. **Seed Science Research**, v.4, p.307-313, 1994.

ENGELMANN, F. *in vitro* conservation methods. In.: FORD-LLOYD, B.V.; NEWBURRY, J.H.; CALLOW, J.A. **Biotechnology and Plant Genetic Resources: Conservation and Use**. CABI: Wallingford, 1997. p.119-162.

ESCOBAR, R.H. ROCA, W.M.; GUEVARA, C. Cryopreservation of cassava shoot tips in liquid nitrogen. **Biotechnology Research Unit Annual Report**, CIAT, Cali, p.82-84, 1995.

ESCOBAR, R.H.; MAFLA, G.; ROCA, W.M. Cassava cryopreservation I. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. **Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research progress and application**, Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Japan/International; Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000a. p.404-407.

ESCOBAR, R.H.; PALACIO, J.D.; RANGEL, M.P.; ROCA, W.M.. Cassava cryopreservation II. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. **Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research progress and application**, Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Japan/International; Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000b. p.408-410.

FABRE, J.; DEREUDRE, J. Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. **Cryo-Letters**. v.11, p.413-426, 1990.

- GONZÁLEZ-ARNAO, M.T.; MOREIRA, T.; URRÁ, C. Importance of pregrowth with sucrose and vitrification for the cryopreservation of sugarcane apices using encapsulation-dehydration. **Cryo-Letters**. v.17, p.141-148, 1996.
- GONZÁLEZ-ARNAO, M.T.; RAVELO, M.M.; VILLAVICENCIO, C.U.; MONTERO, M.E.M.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus*) apices by vitrification. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (ed.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Japan/International; Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p.390-392.
- GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; NÚÑEZ-MORENO, Y.; MARTÍN, C. A protocol to cryopreserve nodal explants of *Antirrhinum microphyllum* by encapsulation-dehydration. **Cryo-Letters**. v.19, p.225-230, 1998.
- GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; PÉREZ, C. Cryopreservation of nodal explants of an endangered plant species (*Centaurium rigualii* Esteve) using the encapsulation-dehydration method. **Biodiversity and Conservation**, v.6, p.583-590, 1997.
- HASAN, S.M.Z.; TAKAGI, H. Alginated-coated nodal segments of yam (*Dioscorea* spp.) for germplasm exchange and distribution. **Plant Genetic Resources Newsletter**. n. 103, p.32-35, 1995.
- HASKINS, R.H.; KARTHA, K.K. Freeze preservation of pea meristems: cell survival. **Canadian Journal of Botany**, v.58, p.833-840, 1980.
- HORNUNG, R.; TAYLOR, H.F.; LYNCH, P.T. Cryopreservation of auricular shoot tips using the encapsulation/dehydration technique. **Cryo-Letters**, v.22, p.27-34, 2001.
- HUANG, C.N.; WANG, J.H.; YAN, Q.S.; ZHANG, X.Q.; YAN, Q.F. Plant regeneration from rice (*Oryza sativa* L.) embryogenic suspension cells cryopreserved by vitrification. **Plant Cell Reports**. v.14, p.730-734, 1995.
- KARTHA, K.K.; GAMBORG, O.L.; CONSTABEL, F.; SHULUK, J.P. Regeneration of cassava plants from apical meristems. **Plant Science Letters**. v.2, 107-113, 1974.
- KARTHA, K.K.; LEUNG, N.L.; GAMBORG, O.L. Freeze-preservation of pea meristems in liquid nitrogen and subsequent plant regeneration. **Plant Science Letters**. v.15, p.7-15, 1979.

KARTHA, K.K.; LEUNG, L.; PAHL, K. Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v.105, p.481-484, 1980.

KARTHA, K.K. Meristem culture and germplasm preservation. In: KARTHA, K.K. **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1985. p.115-134.

KOSTER, L.K. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, v.96, p.302-304, 1991.

MATSUMOTO, T.; SAKAI, A.; TAKAHASHI, C.; YAMADA, K. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrification method. **Cryo-Letters**. v.16, p.189-196, 1995.

MINAMI, T.; SAWAI, A. Cryopreservation of shoot apices of lawngrass by encapsulation-dehydration. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. **Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research progress and application**, Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Japan/International; Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p.426-428.

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

NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. In: MERYMAN, M.T. **Cryobiology**, London: Academic Press, 1966. p.179-211.

NINO, T.; SAKAI, A.; YAKUWA, H. Cryopreservation of dried tips of mulberry winter buds and subsequent plant regeneration. **Cryo-Letters**. v.13, p.51-58, 1992.

NISHIWAZA, S.; SAKAI, A.; AMANO, Y.; MATSUZAWA, T. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by a simple freezing method. **Cryo-Letters**, v.13, p.379-388, 1992.

PANIS, B.; TOTTE, N.; VAN NIMMÉN, K.; 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.; GLASZMANN, J.C. Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of sugarcane (*Saccharum* sp. Hybrids) using encapsulation/dehydration. **Plant Cell Reports**, v.12, p.525-529, 1993.

REED, B.M.; YU, X. Cryopreservation of *in vitro*-grown gooseberry and currant meristems. **Cryo-Letters**. v.6, p.131-136, 1995.

SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry, 32. Cryopreservation of plant germplasm I**. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1995, p.53-69.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OLYAMA, 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.; SUGAWARA, Y. Survival of plant germ plasm in liquid nitrogen. In: LI, P.H.; SAKAI, A. **Plant Cold Hardiness and Freezing Stress**, New York: Academic Press, 1978. p.345-359.

SANTOS, I.R.I.; STUSHNOFF; C. Cryopreservation of embrionic axés of *Citrus* species by encapsulation-dehydration. **Plant Genetic Resources Newsletter**, n.131, p.36-41, 2002.

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.

SHATNAWI, M.A.; ENGELMANN, F.; FRATTARELLI, A.; DAMIANO, C. Cryopreservation of almond apices using encapsulation-dehydration and vitrification. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. **Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research progress and application**, Rome: IPGRI, 2000. p.434-436.

SHIBLI, R.A.; AL-JUBOORY, K.H. Cryopreservation of 'nabali' olive (*Olea europea* L.) somatic embryos by encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification. **Cryo-Letters**, v.21, p.357-366, 2000.

SILVA, S.O.; SHEPHERD, K.; DANTAS, J.L.L.; SOUZA, A.S.; CARNEIRO, M.S. Germoplasma. In: ALVES, E.J. **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Brasília: Embrapa-CNPMPF, 1997. p.61-84.

SUDARMONOWATI, E.; MULYANINGSIH, E.S.; PRIADI, D.; SAKAI, A. Cryopreservation of shoot-tips of two leguminous trees (*Acacia mangium* and



*Paraserianthes falcataria*) using encapsulation-dehydration and vitrification.

**Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm**, Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Japan/International; Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p.449-452.

TAKAGI, H.; THINH, N.T.; ISLAM, O.M.; SENBOKU, T.; SAKAI, A.

Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] by vitrification. 1. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure. **Plant Cell Reports**, v.16, p.594-599, 1997.

TOWILL, L.E.; Survival of ultra-low temperatures of shoot-tips from *Solanum tuberosum* groups *andigena*, *phureja*, *stenotomum* and other tuber-bearing *Solanum* species. **Cryo-Letters**, Cambridge, v.5, p.319-326, 1984.

TOWILL, L.E.; JARRET, R.L. Cryopreservation of sweet potato [*Ipomea batatas* (L.) Lam.] shoot tips by vitrification. **Plant Cell Reports**, v.11, p.175-178, 1992.

UEMURA, M.; SAKAI, A. Survival of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot apices frozen to the temperature of liquid nitrogen. **Plant and Cell Physiology**. v.21, n.1, p.85-94, 1980.

URAGAMI, A.; SAKAI, A.; NAGAI, M. Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown *in vitro*. **Plant Cell Reports**. v.9, p.328-331, 1990.

VANDENBUSSCHE, B.; WEYENS, G.; PROFT, M.D. Cryopreservation of *in vitro* sugar beet (*Beta vulgaris* L.) shoot tips by a vitrification technique. **Plant Cell Reports**, v.19, p.1064-1068, 2000.

VIEIRA, M.L.C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Biociência**. Brasília: KL3. v.3, n.14, p.18-20, 2000.

WITHERS, L.A. *In vitro* conservation. **Biology Journal Linn Science**. v.43, p.31-42, 1991.

WITHERS, L.A.; ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of plant genetic resources. In: ALTMAN, A. **Biotechnology in Agriculture**. Marcel Dekker, NY, 1997, p.57-88.

WU, Y.; ENGELMANN, F.; FRATTARELLI, A.; DAMIANO, C. A cryopreservation protocol for strawberry cell suspension cultures. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H.

**Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research progress and application**, Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Japan/International; Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p.357-359.

WU, Y.; ZHAO, Y.; ENGELMANN, F.; ZHOU, M. Cryopreservation of kiwi shoot tips. **Cryo-Letters**, v.22, p.277-284, 2001.

YAMADA, T.; SAKAI, A.; MATSUMURA, T.; HIGUCHI, S. Cryopreservation of apical meristems of white clover (*Trifolium repens* L.) by vitrification. **Plant Science**. v.78, p.81-87, 1991.

YAMADA, T. Cryopreservation of forage crops. In: Cryopreservation of plant genetic resources, Technical assistance activities for resources projects N°6, **JICA**, Japan, 1993.

## CAPÍTULO 3

### Criopreservação de Eixos Embrionários Zigóticos de Algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)

#### 1 RESUMO

LOPES, Kilson Pinheiro. **Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de algodoeiro** (*Gossypium hirsutum* L.). Areia: UFPB/CCA, 2005. p.87-109 (Tese - Doutorado em Agronomia)<sup>4</sup>

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) é uma cultura de grande importância no Brasil e no mundo. A busca por cultivares cada vez mais adaptadas que atendam a demanda vigente exige que os recursos genéticos desta espécie sejam facilmente obtidos. A presente pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de avaliar um protocolo para criopreservação de eixos embrionários de algodoeiro como alternativa para a manutenção dos recursos genéticos da espécie. Foram utilizadas sementes de algodoeiro das cultivares BRS 200 e BRS 201, com germinação em torno de 96%, teores de água ajustados para 6 a 8%. Procedido sua esterilização foram mantidas em embebição em água por 24 horas para posterior excisão dos eixos embrionários em câmara de fluxo laminar, onde permaneceram em dessecação por 0, 30, 60 e 90 minutos para em seguida serem submetidos a criopreservação, por meio da imersão direta em nitrogênio líquido (-196°C), durante 0, 5, 30 e 60 dias. A reativação dos eixos embrionários foi realizada a cada período de armazenamento, após sua retirada e descongelamento em condições de ambiente, durante 60 minutos, sendo cultivados em meio MS sob condições de câmara regulada a temperatura de 25°C, fotoperíodo de 16/8 horas (claro/escuro) e intensidade luminosa de 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Aos 30 dias de cultivo, foram realizadas avaliações da regeneração, comprimento de plântulas e números de raízes emitidas. Procedeu-se análise de variância e regressão polinomial dos dados obtidos, para cada cultivar, em função do período de dessecação e armazenamento. O teor de água limite recomendado para a criopreservação de eixos embrionários de algodoeiro está entre 9 e 16% com base no peso fresco; eixos embrionários de algodoeiro devem ser dessecados para teor de água inferior a 16% para assegurar um ótimo de regeneração *in vitro*, após imersão em nitrogênio líquido; eixos embrionários de algodoeiro, com umidade em torno de 9,7%, podem ser conservados em bancos de germoplasma em condições criogênicas e regenerar mais de 80% de plântulas *in vitro* após 60 dias de armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C).

---

<sup>4</sup> Comitê Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida – UFCG/CCT (Orientador), Dra. Julita Maria Frota Chagas Carvalho – EMBRAPA/CNPA, Prf<sup>a</sup>. Dra. Riselane de Lucena Alcântara Bruno – UFPB/CCA.

## 2 ABSTRACT

LOPES, Kilson Pinheiro. **Cryopreservation of embryonic axes zygotic of cotton** (*Gossypium hirsutum* L.). Areia: UFPB/CCA, 2005. p.87-109 (Thesis - Doctorate in Agronomy)\*

The cotton (*Gossypium hirsutum* L.) it is a culture of great importance in Brazil and in the world. The search for you cultivate more and more adapted that assist the effective demand it demands that the genetic resources of this species are obtained easily. To present research it was developed with the aim of evaluating a protocol for cryopreservation of embryonic axes of cotton as alternative for the maintenance of the genetic resources of the species. cotton seeds were used of the you cultivars BRS 200 and BRS 201, with germination around 96%, moisture content adjusted for 6 to 8%. Proceeded your sterilization they were maintained in imbibition in water for 24 hours for subsequent excised of the embryonic axes in flow camera to laminate, where they stayed in desiccation for 0, 30, 60 and 90 minutes for soon after to be submitted to the cryopreservation, directly plunged into liquid nitrogen (-196°C), during 0, 5, 30 and 60 days. The regrowth of the embryonic axes was accomplished to each storage period, after your retreat and thawing in room temperature conditions, for 60 minutes, being cultivated in MS medium and kept in the incubator room at temperature of 25°C, photoperiod of 16/8 hours (light/dark) and intensity light of 50 mol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. To the 30 days of cultivation, evaluations of the regeneration, plantlets length and numbers of emitted roots were accomplished. It was proceeded variance analysis and regression polinomial of the obtained data, for each to cultivat, in function of the desiccation period and storage. The tenor of water limits recommended for the crypreservation of embryonic axes of cotton it is between 9 and 16% with base in the fresh weight; embryonic axes of cotton should be desiccated for moisture content lower to 16% to assure a great of regeneration *in vitro*, after plunged into liquid nitrogen; embryonic axes of cotton, with moisture conten around 9,7%, they can be conserved in germoplasma banks in cryogenic conditions and to regenerate more than 80% of plantlets *in vitro* after 60 days of storage in liquid nitrogen (-196°C).

---

\*Guidance Committee: Prof. Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida – UFCG/CCT (Orientador), Dra. Julita Maria Frota Chagas Carvalho – EMBRAPA/CNPA, Prof<sup>a</sup>. Dra. Riselane de Lucena Alcântara Bruno – UFPB/CCA.

### 3 INTRODUÇÃO

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) é uma das mais importantes culturas exploradas no Brasil e no mundo, apresentando-se como ótima fornecedora de fibra para a indústria têxtil e óleo para a indústria alimentícia, entre outros subprodutos, gerando emprego e renda ao longo de sua cadeia produtiva.

Os programas de melhoramento lançam cultivares cada vez mais adaptadas às diversas condições, com características que atendam às demandas vigentes, tanto dos produtores como da indústria têxtil e dos beneficiadores, como: resistência a estresses do ambiente, resistência a pragas e doenças, maior produtividade, porte adequado para colheita, fibras mais compridas e resistentes e maior quantidade de óleo em suas sementes (CARVALHO, 1999). Mais recentemente, é notório o interesse por se obter cultivares de algodoeiro com fibras coloridas (FREIRE, 1999).

Para o desenvolvimento dessas novas cultivares, é fundamental a existência da variabilidade genética da espécie cujos recursos genéticos possam ser facilmente obtidos, residindo aí a importância dos bancos de germoplasma (EIRA e REIS, 2004).

A conservação dos recursos genéticos implica na manutenção de coleções *in situ*, ou seja, nos seus locais de ocorrência, ou *ex situ*; neste caso, podem ser mantidos indivíduos, sementes, embriões ou outras estruturas vegetais, sob diferentes condições, dependendo do material utilizado: no campo ou em casa de vegetação, em câmara seca sob baixa temperatura, em meio de cultura com baixa concentração salina, ou criopreservadas (CGIAR, 1993 e VALOIS, 1998).

A sementes é a forma mais comum de conservação *ex situ*, uma vez que é a unidade de propagação natural para a maioria das espécies de plantas superiores. A metodologia convencional compreende a desidratação das sementes para teores de umidade extremamente baixos e armazenamento em câmaras com controle de temperatura e umidade relativa. Segundo Cromarty *et al.* (1982) estas condições permitem a preservação de material vegetal por longos períodos de tempo. Porém, pode ocorrer perda da viabilidade com o prolongamento do armazenamento, dependendo da espécie (ROBERTS e ELLIS, 1984).

A criopreservação, manutenção de material biológico sob temperaturas ultra-reduzidas (nitrogênio líquido, -196°C), tem garantido conservação por períodos indefinidos, por reduzir muito ou praticamente paralisar qualquer atividade a nível celular, minimizando a deterioração biológica durante o armazenamento (STANWOOD, 1985; PRITCHARD, 1995); sendo assim, segundo Toribio e Celestino (2000), a criopreservação pode ser uma ferramenta de grande utilidade para a conservação de recursos genéticos vegetais, principalmente do algodoeiro.

Stanwood e Bass (1978) relatam elevada porcentagem de germinação de sementes de *Gossypium hirsutum* L. criopreservadas com conteúdo de umidade inferior a 13%; já González-Benito *et al.* (1998) afirmam que, para assegurar o ótimo de germinação de sementes de algodoeiro, após imersão em nitrogênio líquido, elas devem ser dessecadas previamente para teor de umidade em torno dos 3%; já Rocha (2004) afirma estar entre 6 e 8% o teor de água limite para a crioconservação de sementes de algodoeiro.

Atualmente, a criopreservação de eixos embrionários se vem destacando como a metodologia mais apropriada para a conservação a longo prazo da diversidade genética das espécies vegetais, uma vez que os eixos toleram condições que seriam letais para a semente inteira (BERJAK *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2002). González-Benito *et al.* (1998) resgataram, *in vitro*, eixos embrionários de algodoeiro criopreservados com teor de água abaixo de 20%, sem perda da viabilidade.

Embriões zigóticos são sistemas de tecidos simples, altamente organizados, que podem ser usados para produzir uma planta completa. E são apropriados para ajudar a reduzir o risco de variação somaclonal em cultura que outros métodos de regeneração de plantas *in vitro*; ademais, embriões zigóticos são usado com sucesso para criopreservação do germoplasma de muitas espécies vegetais que possuem sementes recalcitrantes, intermediárias ou com problemas no armazenamento (PENCE, 1990; BERJAK *et al.*, 2000).

Considerando-se a importância de ser empregar eixos embrionários zigóticos como elemento de preservação de germoplasma de algodoeiro, foi realizado este trabalho com o objetivo de desenvolver um protocolo para a criopreservação de eixos embrionários de algodoeiro como alternativa para a conservação dos recursos genéticos da espécie.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material vegetal e procedimentos para excisão dos eixos embrionários**

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Centro Nacional de Pesquisa do Algodão (EMBRAPA-Algodão), em Campina Grande, PB. Utilizaram-se sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), cultivares BRS 200 (pluma marrom) e BRS 201 (pluma branca), colhidas em campos de produção da EMBRAPA-Algodão, na safra 2001/2002.

A caracterização da viabilidade inicial das sementes, revelou germinação em torno de 96%. O teor de umidade permitido para a criopreservação 6 a 8% b.u. (Rocha, 2004) foi obtido empregando-se a fórmula proposta por Almeida *et al.* (1997) para promover a perda ou o ganho de água. Procedeu-se à esterilização das sementes em solução de hipoclorito de sódio comercial (Brilux) a 40% (v/v), com 2,0 a 2,5% de cloro ativo, acrescida com 1 a 2 gotas de polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween-20<sup>®</sup>), sob agitação durante 20 minutos, seguida de tríplex lavagem em água bidestilada esterilizada.

### **4.2 Exposição ao nitrogênio líquido**

Após esterilização, as sementes permaneceram em embebição durante 24 horas, em água bidestilada esterilizada e foram então levadas para excisão de seus eixos embrionários na câmara de fluxo laminar, onde foram submetidos a dessecação por 0, 30, 60 e 90 minutos, sob temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  sendo, em seguida, colocados em recipientes estéreis de polipropileno de 4,5 mL, em número de quatro réplicas de 10 eixos embrionários por frasco e imersos diretamente no nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , onde permaneceram 0, 5, 30 e 60 dias.

Após cada período de dessecação, separaram-se três repetições de 30 eixos embrionários para a determinação do teor de água, no momento de sua crioconservação, por meio da pesagem e secagem em estufa regulada a  $103\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 17 horas, conforme recomendado pela International Seed Testing Association (ISTA, 1985). O teor de água foi expresso em porcentagem, com base no peso fresco.

### **4.3 Avaliação da sobrevivência**

Após cada período de criopreservação, criotubos contendo os eixos embrionários foram retirados e postos para descongelar, sob temperatura ambiente ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ), durante 60 minutos; posteriormente, eixos embrionários foram cultivados em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, contendo 10 mL de meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), devidamente vedados e mantidos em câmara de crescimento regulada a temperatura de  $25^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16/8 horas (claro/escuro) e intensidade luminosa em torno  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  proporcionada por lâmpadas fluorescentes brancas frias. As avaliações foram realizadas no 30º dia após cultivo, mediante a porcentagem de regeneração, a mensuração do comprimento de plântulas e contagem do número de raízes emitidas.

### **4.4 Procedimento estatístico**

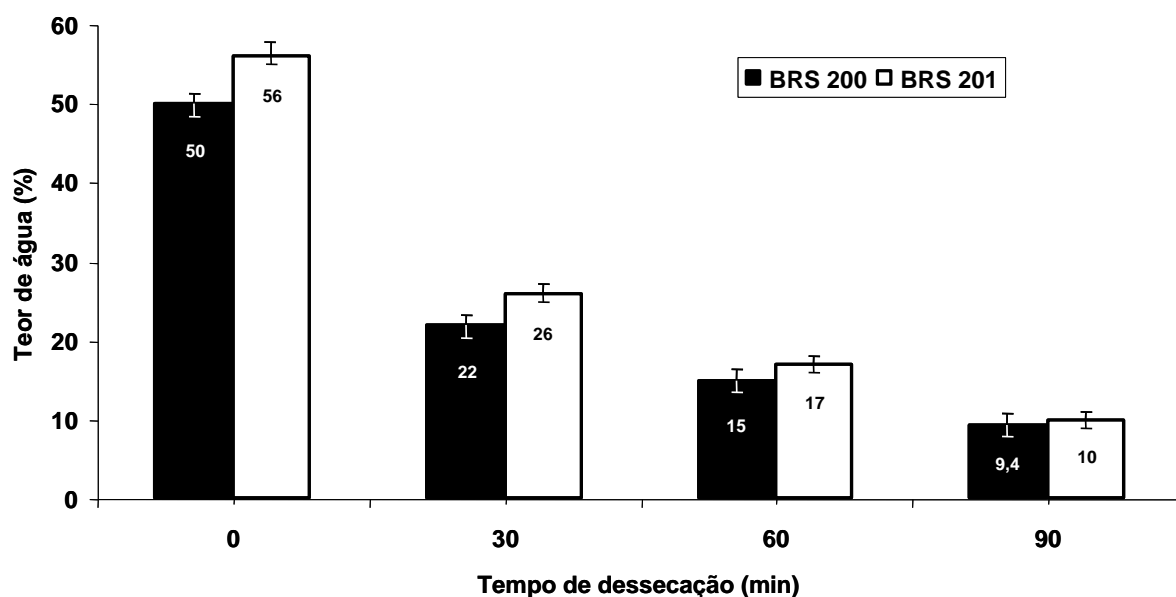
Os dados foram analisados de acordo com o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $2 \times 4 \times 4$ , sendo duas cultivares (BRS 200 e BRS 201), quatro tempos de dessecação (0, 30, 60 e 90 minutos) e quatro períodos de armazenamento dos eixos embrionários (0, 5, 30 e 60 dias), procedendo-se à análise de variância e regressão polinomial, para cada cultivar, em função do tempo de dessecação e do período de armazenamento, utilizando-se dos modelos de superfície de resposta, selecionou-se aquele em que todas as variáveis do modelo apresentaram contribuição significativa. Antes da análise, os dados referentes ao comprimento de plântulas foram transformados para  $\sqrt{X + 1}$ .

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Sementes de algodoeiro das cultivares BRS 200 e BRS 201 com umidade entre 6 e 8%, foram submetidas a embebição, por 24 horas, e apresentaram eixos embrionários com teor de água médio de 53%, após excisão (Figura 1). Quando os eixos embrionários foram submetidos a dessecação em câmara de fluxo laminar, ocorreu redução do teor de água em valores médios, para ambas as cultivares, na ordem de 24, 16 e 9,7%, após 30, 60 e 90 minutos de dessecação, respectivamente. A redução de água dos eixos embrionários a um nível possível



submetê-lo a temperatura do nitrogênio líquido e/ou evitar a formação de cristais de gelo é o passo mais crítico na obtenção de um protocolo viável de criopreservação. Isto é confirmado por Toríbio e Celestino (2000), esclarecendo ainda que, em geral, as sementes, os embriões e os eixos embrionários se crioconservam prévio a desidratação por ar.



**Figura 1.** Teor de água, em porcentagem, de eixos embrionários oriundos de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) cultivares BRS 200 e BRS 201, submetidas a dessecação em câmara de fluxo laminar. Barras representam a média de três réplicas em cada tratamento.

Encontra-se, no Apêndice 1C, o resumo da análise de variância, que detectou efeitos significativos para a maioria das variáveis estudadas, excetuando a interação dupla entre cultivar x armazenamento, na porcentagem de regeneração; a interação dupla entre cultivar x dessecação, assim como a interação entre todas as variáveis (cultivar x dessecação x armazenamento) no comprimento de plântulas originadas dos eixos embrionários de algodoeiro.

Eixos embrionários de algodoeiro da cultivar BRS 201, submetidos a criopreservação, apresentaram maior regeneração quando comparados com os da cultivar BRS 200, apesar desta superar aquela, no comprimento de plântula e no número de raízes emitidas por seus eixos embrionários (Tabela 1). Estes resultados indicam que as diferenças apresentadas entre cultivares e/ou

variedades de uma mesma espécie, quando submetidas a criopreservação, se devem, provavelmente, ao patrimônio genético de cada variante, não havendo efeitos da criopreservação sobre a viabilidade e/ou vigor das cultivares estudadas, estando esta afirmação de acordo com Batista (2000); Almeida *et al.*, (2002) e Cavalcanti Mata *et al.* (2002).

**Tabela 1.** Valores médios de regeneração, comprimento de plântula e número de raízes emitidas por eixos embrionários de duas cultivares de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), submetidos ao armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C).

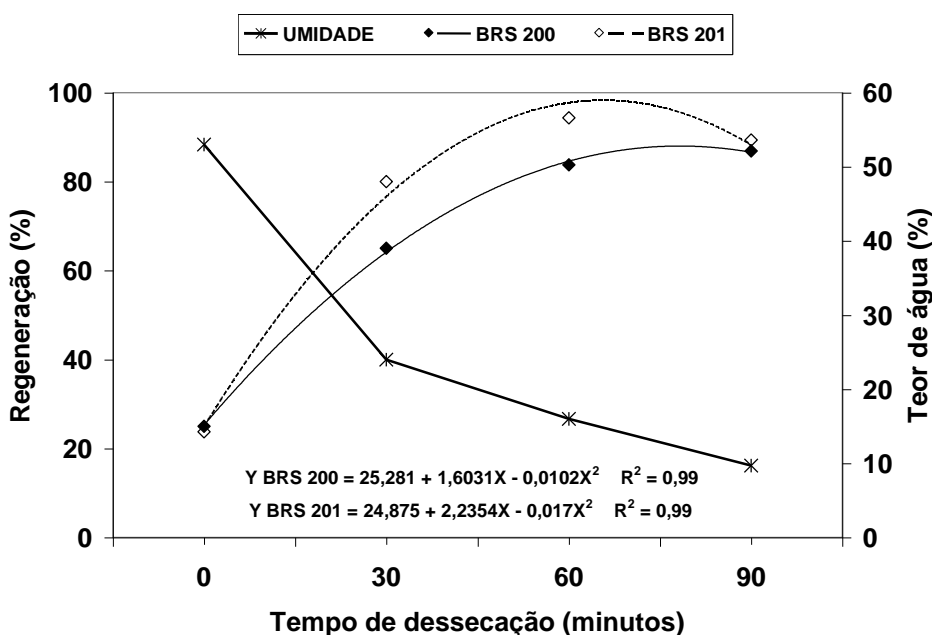
Fator	Regeneração (%)	Comprimento de Plântula <sup>1</sup> (cm)	Número de Raízes Emitidas
Cultivares			
BRS 200	65,16 b	2,83 a	26,64 a
BRS 201	71,88 a	2,28 b	15,63 b
DMS	3,05	0,22	0,95

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup> Dados transformados em  $\sqrt{X+1}$

Quanto a porcentagem de regeneração de eixos embrionários de algodoeiro das cultivares BRS 200 e BRS 201, submetidos a criopreservação (Figura 2), houve variação em função da sua permanência sob dessecação em câmara de fluxo laminar e do teor de água, que apresentavam, no momento da criopreservação (Figura 1), de modo que, quanto mais tempo os eixos embrionários permaneceram dessecando, menor foi o seu teor de água e maior sua capacidade de resistir às condições do nitrogênio líquido e regenerar uma plântula normal. Eixos embrionários de algodoeiro com teor de água inferior a 16% (b.u.), valor este atingido após 60 minutos de dessecação, garantiram, em média, regeneração de 85% e 98%, para as cultivares BRS 200 e BRS 201, após criopreservação. Conforme se observa, eixos embrionários de algodoeiro dessecados em câmara de fluxo laminar até teor de água inferior a 16% (b.u.) com boa qualidade fisiológica podem ser criopreservados com segurança, não apresentando problemas no que diz respeito a velocidade de congelamento e descongelamento que venham a prejudicar a sua capacidade de regeneração. A regeneração obtida na ordem de 85 e 98% para as cultivares BRS 200 e BRS 201, respectivamente, dos eixos embrionários com 16% (b.u.) do teor de água após imersão direta no nitrogênio líquido, indicam que a criopreservação pode ser facilmente realizada, mantendo-se a ressalva de que o material criopreservado

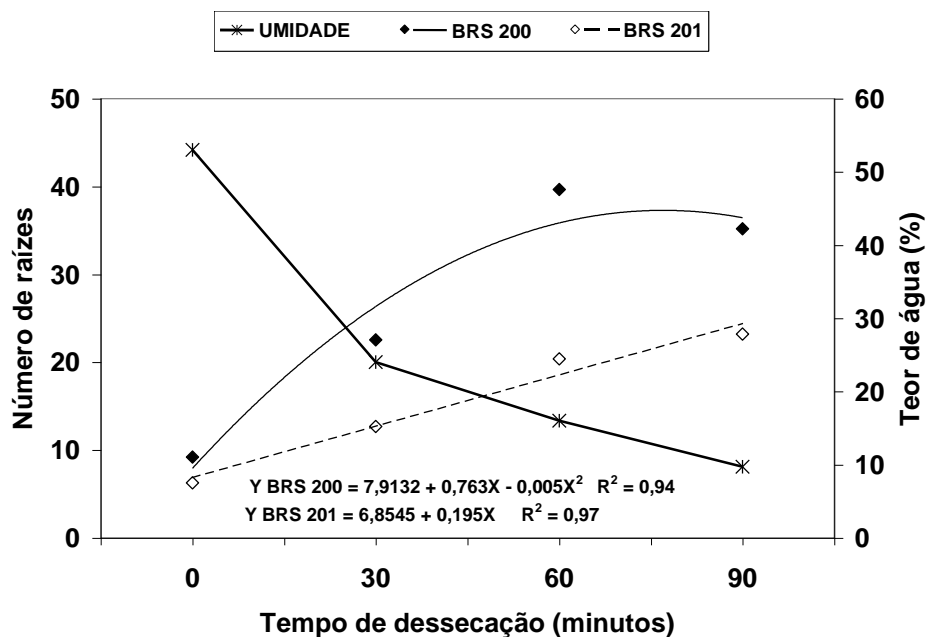
pode apresentar diferenças no posterior desenvolvimento das plantas. Ante o abordado Roberts (1973), afirma que baixos conteúdos de umidade reduzem a formação de gelo nas estruturas intracelulares da semente, quando expostas às temperaturas subzero, atenuando assim, possíveis danos decorrentes do congelamento. Santos *et al.* (2002), obtiveram total regeneração (100%) *in vitro* de eixos embrionários de sementes de café com 12,6% de umidade, após congelamento em nitrogênio líquido.



**Figura 2.** Porcentagem de regeneração de eixos embrionários de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) cultivares BRS 200 e BRS 201, em função do tempo de dessecação em câmara de fluxo laminar e do teor de água, sob o armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C).

O número de raízes emitidas por eixos embrionários também sofreu alteração após criopreservação, em função do teor de água que os mesmos continham após cada tempo de dessecação (Figura 3). Um número maior de raízes (37 raízes/plântula) foi obtido para eixos embrionários criopreservados da cultivar BRS 200, aos 76 minutos de dessecação; já o número de raízes emitidas de eixos embrionários da cultivar BRS 201, após criopreservação, apresentou tendência linear crescente, a medida em que houve redução no teor de água, na dessecação. Diante do observado, a dessecação contribui na capacidade regenerativa dos eixos embrionários de sementes do algodoeiro criopreservados, garantindo a regeneração de plântulas com um maior número de raízes (Figura 3)

e conseqüentemente mais vigorosas (Figura 2). Portanto, a maior emissão de radícula indica que os eixos embrionários foram dessecados a um nível do teor de água que não causou danos às suas células após criopreservação. Este fato é de extrema importância e encontram apóio nos relatos de Mumford e Grout (1979), que observaram uma maior emissão de radículas em embriões dessecados de *Citrus limon* L..



**Figura 3.** Número de raízes emitidas por eixos embrionários de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) cultivares BRS 200 e BRS 201, em função do tempo de dessecação em câmara de fluxo laminar e do teor de água, sob o armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C).

O estudo conjunto dos efeitos do tempo de dessecação e do período de armazenamento dos eixos embrionários de algodoeiro das cultivares BRS 200 e BRS 201, sobre sua regeneração, comprimento de plântulas e número de raízes emitidas, encontra-se na Tabela 2 e nas Figuras 4, 5 e 6. Eixos embrionários, de ambas as cultivares, quando não submetidos a dessecação não resistiram ao armazenamento criogênico e, nestas condições, não apresentaram qualquer manifestação de atividade metabólica (Tabela 2 e Figuras 4, 5 e 6). O teor de água dos eixos embrionários de ambas cultivares, que se encontrava em torno de 53%, foi o fator limitante para tal comportamento (Figura 1), evidenciando a necessidade da realização da dessecação dos eixos embrionário para teores de

umidade que permitam a sua criopreservação. Os dados apresentados vão de encontro àquele obtidos por Almeida *et al.* (2000), onde criopreservaram, com sucesso, sementes de diversas leguminosas que continham em média o teor de água entre 6-7%.

**Tabela 2.** Valores médios de regeneração, comprimento de plântulas e número de raízes emitidas de eixos embrionários de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) submetidos a dessecação e ao armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C).

		Tempo de Dessecação (minutos)							
		Regeneração (%)							
		0		30		60		90	
		BRS 200	BRS 201	BRS 200	BRS 201	BRS 200	BRS 201	BRS 200	BRS 201
Período de Armazenamento (dias)	0	92,5	95	85	100	90	100	90	97,5
	5	0	0	55	75	85	90	85	95
	30	0	0	75	75	80	100	80	72,5
	60	0	0	45	70	80	87,5	80	92,5
		Comprimento de plântulas (cm) <sup>1</sup>							
		0		30		60		90	
		BRS 200	BRS 201	BRS 200	BRS 201	BRS 200	BRS 201	BRS 200	BRS 201
		0	3,39	2,75	3,37	2,73	3,52	2,53	3,32
Período de Armazenamento (dias)	5	1	1	1,96	2,32	3,33	2,46	3,32	2,85
	30	1	1	2,08	2,10	3,87	2,76	3,45	2,80
	60	1	1	2,32	2,08	3,60	2,85	3,30	2,85
			Número de raízes						
0			30		60		90		
		BRS 200	BRS 201	BRS 200	BRS 201	BRS 200	BRS 201	BRS 200	BRS 201
		0	36,66	25,05	44,07	27,23	49,03	25,65	37,00
Período de Armazenamento (dias)	5	0	0	6,20	8,17	36,97	20,19	37,74	28,53
	30	0	0	18,34	8,03	37,04	16,55	31,82	21,96
	60	0	0	21,52	7,29	35,63	19,15	34,15	21,72

<sup>1</sup> Valores transformados em  $\sqrt{X+1}$

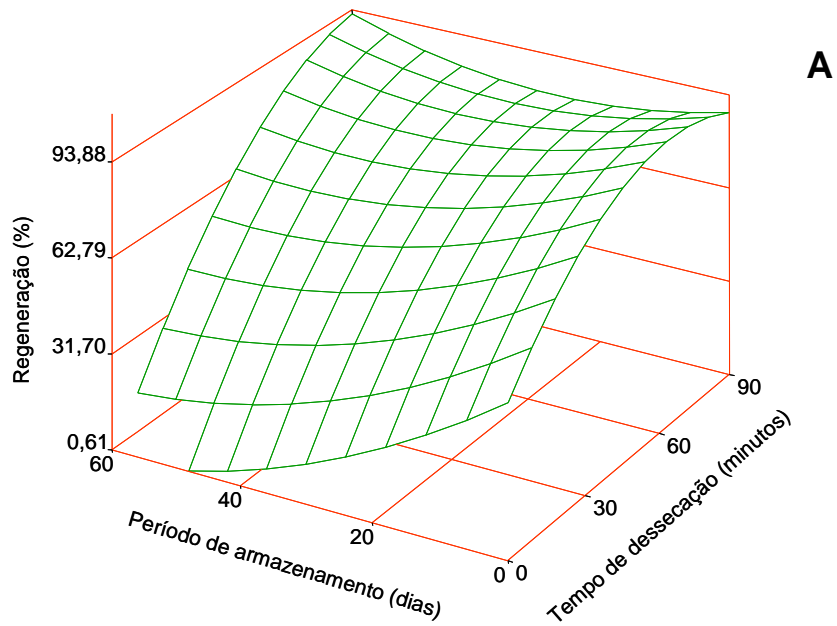
A dessecação dos eixos embrionários por pelo menos 30 minutos em câmara de fluxo laminar, garante regeneração na ordem de 45 e 70%, para as cultivares BRS 200 e BRS 201, respectivamente, após permanência de 60 dias em imersão no nitrogênio líquido (Tabela 2 e Figura 4, A e B); no entanto, o ótimo de regeneração só foi obtido quando os eixos embrionários foram dessecados por

no mínimo 60 minutos, garantindo regeneração superior a 80%, para as duas cultivares, durante todo o período de armazenamento (Tabela 2 e Figura 4, A e B); nestas condições, os eixos embrionários continham teor de água em torno de 16%, para essas cultivares estudadas (Figura 1). Resultados semelhantes foram obtidos para embriões de *Olea europaea* (GONZÁLEZ-RIO *et al.*, 1994) e *Gossypium hirsutum*, cvs. CNPA 4M, CNPA5M, CNPA Precoce 1, CNPA Precoce 2 e Coker 312 (GONZÁLEZ-BENITO *et al.* 1998).

O comprimento de plântulas de algodoeiro da cultivar BRS 201, originadas de eixos embrionários submetidos a dessecação e criopreservação, apesar de apresentar, no geral, menores valores, quando comparado com a cultivar BRS 200 (Tabela 1), demonstrou maior uniformidade nos seus valores, ao longo do armazenamento, independente do tempo em que os eixos embrionários permaneceram sob dessecação na câmara de fluxo laminar (Tabela 2 e Figura 5, B), enquanto os eixos embrionários da cultivar BRS 200 parecem ter sofrido mais a influência do armazenamento em nitrogênio líquido, em função tempo de dessecação, principalmente quando dessecados por apenas 30 minutos (Tabela 2 e Figura 5, A). A perda de viabilidade durante a criopreservação dos eixos embrionários pode ser causada devido a danos físicos sofridos pelas estruturas durante o congelamento e/ou descongelamento, sendo, portanto de grande importância a avaliação das velocidades adequadas dos referidos processos, para garantir a integridade do material quando exposto ao nitrogênio líquido. Esses relatos encontram apoio em Almeida *et al.* (2000). Sob o abordado Stanwood e Bass (1981) sugerem que o congelamento rápido tende a promover um resfriamento mais uniforme da água subcelular e o descongelamento lento evita danos nos tecidos e células da semente. Em contraste, Dumet e Benson (2000) propõem que o congelamento rápido resulta em formação de cristais de gelo intracelulares, o que é letal para as células e os tecidos das sementes.

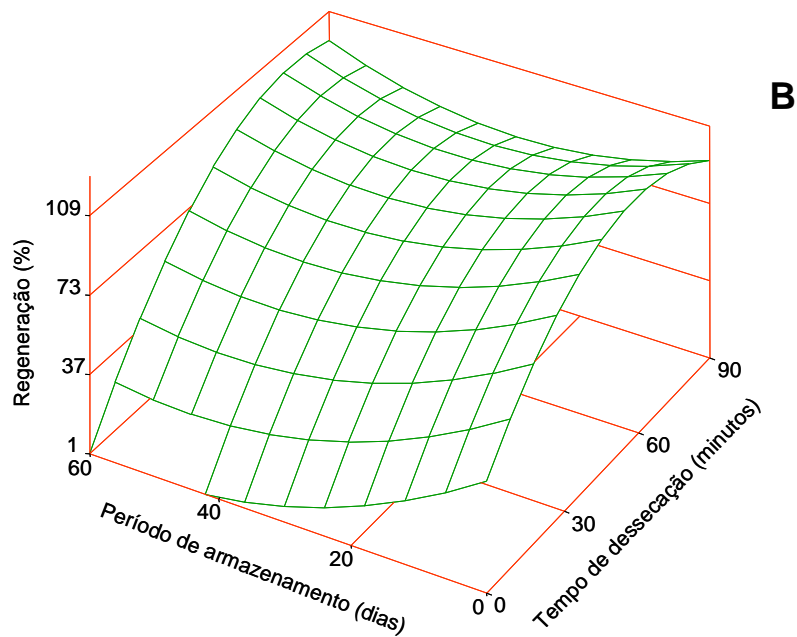
$$\text{Reg (\%)} = 49,6294 - 1,53815**a + 0,0107694**a^2 + 1,34764**d - 0,0102431**d^2 + 0,0107576**ad$$

$$R^2 = 0,75$$



$$\text{Reg (\%)} = 50,0454 - 2,00344**a + 0,019811**a^2 + 2,01188**d - 0,0170139**d^2 + 0,0094123**ad$$

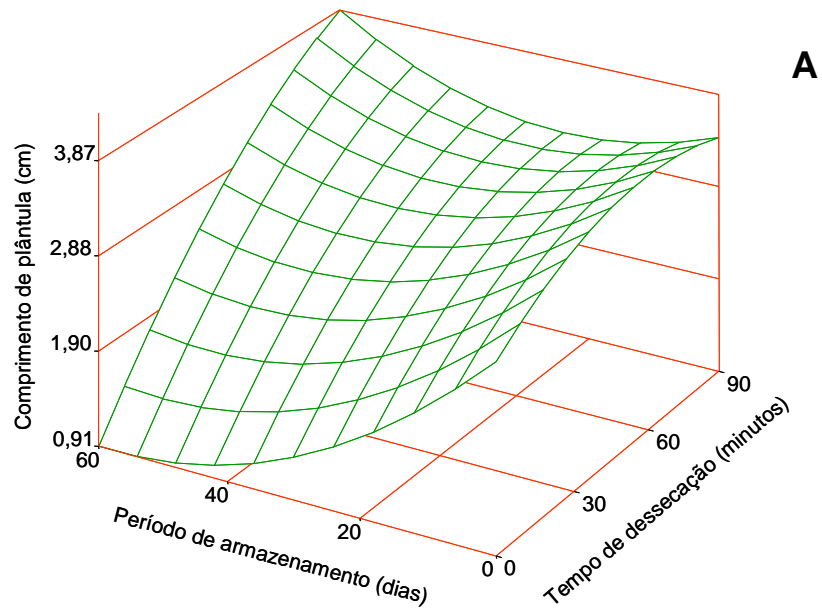
$$R^2 = 0,77$$



**Figura 4.** Porcentagem de regeneração de eixos embrionários de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) em função do tempo de dessecação em câmara de fluxo laminar e do período de armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C). (A) cultivar BRS 200 e (B) BRS 201.

$$\text{Comp} = 2,83793 - 0,0677577^{**}a + 0,000594434^{**}a^2 + 0,0235787^{**}d - 0,000191959d^2 + 0,000442299^{**}ad$$

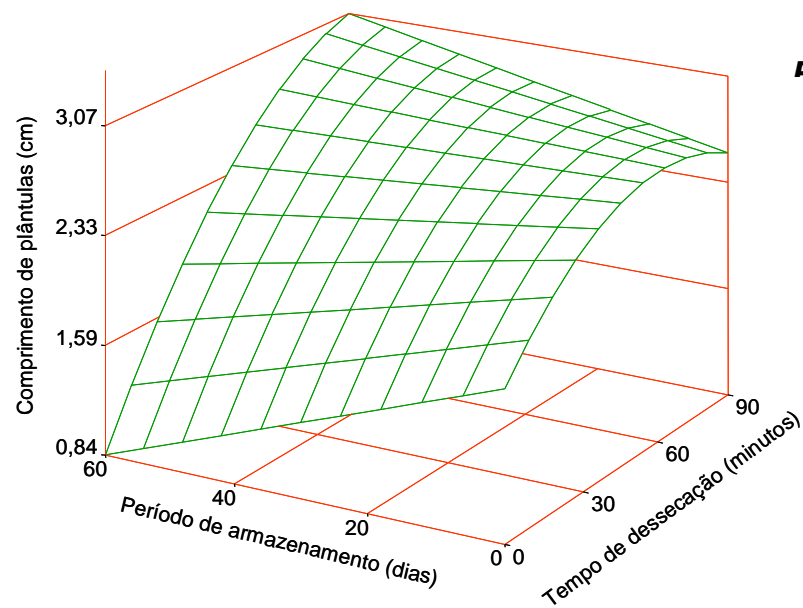
$$R^2 = 0,48$$



**A**

$$\text{Comp} = 1,84828 - 0,0167435^{NS}a + 0,0264376^{**}d - 0,000208734d^2 + 0,000285634^{**}ad$$

$$R^2 = 0,74$$



**B**

**Figura 5.** Comprimento de plântulas originadas de eixos embrionários de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) em função do tempo de dessecação em câmara de fluxo laminar e do período de armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C). (A) cultivar BRS 200 e (B) BRS 201.



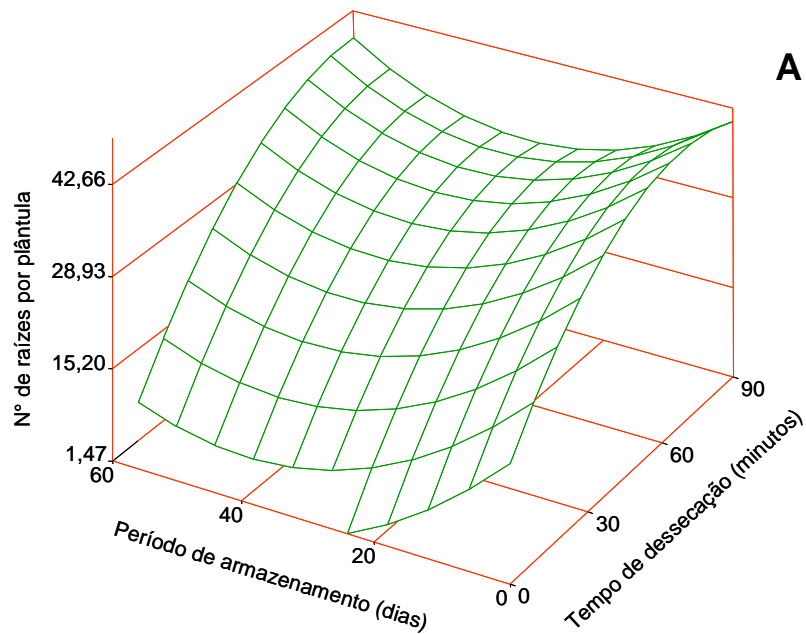
Na Figura 6, o número de raízes emitidas por eixos embrionários de algodoeiro submetidos a dessecação e criopreservação, apresentou comportamento semelhante ao verificado no comprimento de plântulas (Figura 5). A dessecação dos eixos embrionários por, no mínimo, 60 minutos, em câmara de fluxo laminar resultou na redução do seu teor de água para algo em torno de 16%, em ambas as cultivares (Figura 1), o que garantiu a regeneração de plântulas com um número maior de raízes, durante criopreservação (Figura 6, A e B).

Diante dos resultados obtidos, observa-se que processo de dessecação dos eixos embrionários em câmara de fluxo laminar foi de primordial importância para a sobrevivência dos mesmos às condições de temperatura ultra baixa, como a ocorrida no nitrogênio líquido, coincidindo com os resultados obtidos com outros trabalhos (GONZÁLEZ-RIO *et al.*, 1994; GONZÁLEZ-BENITO *et al.* 1998; SANTOS *et al.* 2002), o que indica que a criopreservação pode ser um método adequado para a preservação de eixos embrionários da espécie. Não obstante, antes de generalizar sua utilização, deve-se avaliar sistematicamente, nas diferentes espécies e cultivares, o efeito exercido sobre a integridade física e genética do material criopreservado e o posterior desenvolvimento da planta.

A conservação da biodiversidade vegetal é um objetivo essencial para garantir a solução de problemas que poderão surgir futuramente na agricultura. Até o momento, os bancos de germoplasma são de essencial importância no alcance de tal objetivo, contudo, diante das dificuldades e problemas encontrados, novas tecnologias devem ser avaliadas para otimizar seu funcionamento, o que reforça o estudo da criopreservação de espécies vegetais como forma de garantir a preservação de seus recursos genéticos. O tema abordado encontra apoio nos relatos de Bonner (1990) e Almeida (2000).

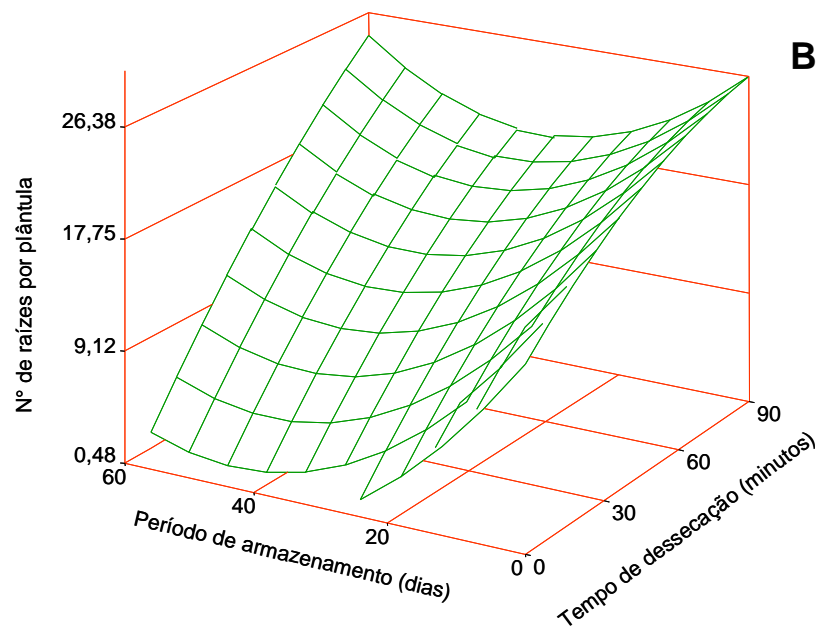
$$\text{Nraiz} = 18,688 - 0,985214**a + 0,0111593**a^2 + 0,689693**d - 0,0049554**d^2 + 0,00308807**ad$$

$$R^2 = 0,67$$



$$\text{Nraiz} = 14,4277 - 0,701694**a + 0,0072405**a^2 + 0,222947**d - 0,100139**d^2 + 0,00261823**ad$$

$$R^2 = 0,71$$



**Figura 6.** Número de raízes emitidas de eixos embrionários de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) em função do tempo de dessecação em câmara de fluxo laminar e do período de armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C). (A) cultivar BRS 200 e (B) BRS 201.

## 6 CONCLUSÕES

O teor de água limite recomendado para criopreservação de eixos embrionários de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) está entre 9 e 16%;

Eixos embrionários criopreservados com 16% (b.u.) do teor de água, apresentam regeneração de plântula *in vitro* de 80% (BSR 200) e 98% (BRS 201);

Eixos embrionários de algodoeiro com umidade em torno de 9,7%, podem regenerar mais de 80% de plântulas *in vitro*, após 60 dias de armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F.A.C.; CAVALCANTI MATA, M.E.R.M. **Conservação dos recursos fitogenéticos da região semi-árida através da crioconservação**. Campina Grande, PB: Universidade Federal da Paraíba, 1997, 37p. (Projeto de Pesquisa).

ALMEIDA, F.A.C.; PITA VILLAMIL, J.M.; GOUVEIA, J.P.G.. Efecto de la crioconservación sobre la germinación de semillas de leguminosas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.2, n.1, p.67-71, 2000.

ALMEIDA, F. de A.C.; MORAIS, A.M. de; CARVALHO, J.M.F.C.; GOUVEIA, J.P.G. de. Crioconservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande, v.6, n.2, p.295-302, 2002.

BATISTA, R.C. **Cultivo *in vitro* e crioconservação de sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L.)**. Campina Grande, 2000. 83p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba.

BERJAK, P.; WALKER, M.; MYCOCK, D.J.; WESLEY-SMITH, J.; WATT, P.; PAMMENTER, N.W. Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Japan/International;

Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p.140-155.

BONNER, F.T. Storage of seeds. Potential and limitations for germplasm conservation. **Forest Ecology and Management**, v.35, p.35-43, 1990.

CARVALHO, L.P. Contribuição do melhoramento ao cultivo do algodão no Brasil. In: BELTRÃO, N.E.M. **O agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília: EMBRAPA-CTT, v.1. 1999, p.253-269.

CAVALCANTI MATA, M.E.R.M.; DINIZ, P.S.C.; BRAGA, M.E.D. Crioarmazenagem de sementes de milho (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v.27, n.2, p.23-30, 2002.

CGIAR (Consultive Group on International Agricultural Research) **People and plants: the development agenda**. Rome, IBPGR, 1993.

CROMARTY, A.S.; ELLIS, R.H.; ROBERTS, E.H. **The Design of Seed Storage Facilities for Genetic Conservation**. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1982. 96p.

DUMET, D.; BENSON, E.E. The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. In: EGELMANN, F.; TAKAGI, H. **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Japan International Research Center for Agricultural Science, Tsukuba, Japan; International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy (JIRCAS/IPGRI). 2000. p. 43-56.

EIRA, T.S.M.; REIS, R.B.R. **Recursos genéticos e biotecnologia- Banco de sementes de café em criopreservação: Experiência inédita no Brasil**. <[http://www.giacometti.org.br/htm/artigo\\_lista.cfm](http://www.giacometti.org.br/htm/artigo_lista.cfm)> Acesso em: 13 de setembro 2004.

FREIRE, E.C. Algodão colorido. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, v.2. n.9., p.36-39, 1999.

GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; CARVALHO, J.M.F.C.; PÉREZ, C. Effect of desiccation and cryopreservation of embryonic axes and seeds of cotton. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.33, n.1, p.17-20, 1998.

GONZÁLEZ-RIO, F.; GURRIARAN, M.J.; GONZÁLEZ-BENITO, E.; REVILLA, M.A. Desiccation and cryopreservation of olive (*Olea europaea* L.) embryos. **Cryo-Letters**, Cambridge, v.15, p.337-342, 1994.

ISTA, International rules for seed testing. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.13, n.2, p.299-355, 1985.

MUMFORD, P.M.; GROUT, W.W. Desiccation and low temperature (-196°C) tolerance of *Citrus limon* seed. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.7, n.3, p.407-410, 1979.

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

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

PRITCHARD, H.W. Cryopreservation of seeds. In: DAY, J.G.; McLELLAN, M.R. **Methods in molecular biology: cryopreservation and freezes-drying protocols**. Totowa: Humana Press Inc., 1995. v.38, p.133-144.

ROBERTS, E.H. Lost of viability: ultrastructural and physiological aspects. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.1, p. 539-545, 1973.

ROBERTS, E.H.; ELLIS, R.H. The implication of the deterioration of orthodox seeds during storage for genetic resources conservation. In: HOLDEN, J.H.W.; WILLIAMS, J. **Crop genetic resources: conservation and evaluation**. London: Allen and Unwin, 1984. p.18-37.

ROCHA, M.S. **Crioconservação e cultivo *in vitro* de sementes de algodão colorido**. Campina Grande, 2004. 112p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande.

SANTOS, I.R.I.; SALOMÃO, A.N.; MUNDIM, R.C. RIBEIRO, F.N.S. **Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de café (*Coffea arabica* L.)**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 2002. 4p. (EMBRAPA-CENARGEN. Comunicado Técnico, 69).

STANWOOD, P.C.; BASS, L.N. Ultra-cold preservation of seed germplasm. In: SAKAI, A.; LI, P. **Plant cold hardiness and freezing stress**. New York: Academic Press, 1978. p.361-371.

STANWOOD, P.C.; BASS, L.N. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.9, p. 423-437, 1981.

STANWOOD, P.C. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: KHARTA, K.K. **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton: CRC Press, 1985. p.199-226.

TORIBIO, M.; CELESTINO, C. El uso de la biotecnología en la conservación de recursos genéticos forestales. **Investigación Agraria**, Madrid, n.2, p.249-259, 2000.

VALOIS, A.C.C. Biodiversidade, biotecnologia e propriedade intelectual (um depoimento). **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v.15, n. especial, p.21-31, 1998.

## CAPÍTULO 4

### Criopreservação de Eixos Embrionários Zigóticos de Mamoneira (*Ricinus Communis* L.)

#### 1 RESUMO

LOPES, Kilson Pinheiro. **Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de mamoneira** (*Ricinus communis* L.). Areia: UFPB/CCA, 2005. p.110-137 (Tese - Doutorado em Agronomia)<sup>5</sup>

A mamona (*Ricinus communis* L.) é uma oleaginosa de grande significância socioeconômica para o Brasil, em especial para a região Nordeste, por sua capacidade de resistir a seca e produzir com rentabilidade. A conservação, a longo prazo, do germoplasma desta espécie, é de fundamental importância e a criopreservação apresenta-se como técnica promissora. A presente pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de se definir um protocolo de extração e dessecação de eixos embrionários de sementes de mamoneira, seu efeito imediato e ao longo do armazenamento criogênico, sobre sua capacidade de regeneração *in vitro*. Utilizaram-se sementes de mamoneira das cultivares BRS 149 - Nordestina e BRS 188 – Paraguaçu, com germinação em torno de 90%, e teores de água ajustados para 4 a 10% e procedido sua esterilização. Uma parte das sementes foi submetida a embebição em água por 24 horas, para posterior extração e outra parte foi levada para extração imediata de seus eixos em câmara de fluxo laminar, onde permaneceram em dessecação por 0, 30, 60 e 90 minutos e submetidos a criopreservação, por meio da imersão direta em nitrogênio líquido (-196°C), durante 0, 5, 30 e 60 dias. A reativação dos eixos embrionários foi realizada a cada período de armazenamento, após sua retirada e descongelamento sob condições de ambiente, durante 60 minutos, e cultivo em meio MS sob condições de câmara regulada a temperatura de 25°C, fotoperíodo de 16/8 horas (claro/escuro) e intensidade luminosa de 30  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Aos 30 dias de cultivo, foram realizadas avaliações de regeneração, comprimento de plântulas e número de raízes emitidas. Procedeu-se à análise de variância e regressão polinomial dos dados obtidos para cada cultivar, em função do período de dessecação e armazenamento. O teor de água limite recomendado para a criopreservação de eixos embrionários de mamona, está entre 4 a 7% (b.u.); eixos embrionários obtidos de sementes embebidas em água por 24 horas, devem ser dessecados durante 90 minutos em câmara de fluxo laminar, antes da criopreservação; eixos embrionários de mamoneira, contendo 5,1% do teor de água, sobrevivem ao congelamento em nitrogênio líquido e regeneram mais de 80% de plântulas *in vitro*, após 60 dias de armazenamento.

---

<sup>1</sup> Comitê Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida – UFCG/CCT (Orientador), Dra. Julita Maria Frota Chagas Carvalho – EMBRAPA/CNPA, Prof<sup>a</sup>. Dra. Riselane de Lucena Alcântara Bruno – UFPB/CCA.

## 2 ABSTRACT

LOPES, Kilson Pinheiro. **Cryopreservation of embryonic axes zygotic of castor bean** (*Ricinus communis* L.). Areia: UFPB/CCA, 2005. p.109-136 (Thesis - Doctorate in Agronomy)\*

The castor bean (*Ricinus communis* L.) it is an oleaginous of great importance socioeconomic to Brazil and, especially, for the northeast area, for your capacity to resist the drought and to produce with profitability. The conservation long term of the germoplasma of this species is of fundamental importance and the cryopreservation he comes as a promising technique. To present research it was developed with the aims of defining an extraction protocol and desiccation of embryonic axes of castor bean seeds, your immediate effect and along the cryogenic storage, about your capacity of regeneration *in vitro*. The castor bean seeds were used of the you cultivars BRS 149 - Nordeste and BRS 188 - Paraguaçu, with germination around 90%, and content moisture adjusted for 4 to 10% and proceeded your sterilization. A part of the seeds was submitted the imbibition in water for 24 hours for subsequent extraction and other part for immediate extraction of your axes in flow camera to laminate, where they stayed in desiccation for 0, 30, 60 and 90 minutes and submitted the cryopreservation, through the directly plunged into liquid nitrogen (-196°C), during 0, 5, 30 and 60 days. The regrowth of the embryonic axes was accomplished to each storage period, after your retreat and thawing under room temperature conditions, for 60 minutes, and cultured in MS medium at temperature of 25°C, photoperiod of 16/8 hours (light/dark) and intensity light of 50 mol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. To the 30 days of cultivation, regeneration evaluations, plantlets length and numbers of emitted roots were accomplished. It was proceeded variance analysis and regression polinomial of the obtained data, for each to cultivar, in function of the desiccation period and storage. The content moisture limits recommended for the cryopreservation of embryonic axes of castor bean it is among 4 to 7% (b.u.); embryonic axes, obtained of seeds imbibed in water by 24 hours, they should be desiccated for 90 minutes in flow camera to laminate before the cryopreservation; embryonic axes of castor bean, containing 5,1% of the moisture content, they survive the freezing in nitrogen liquidate and they regenerate more than 80% of plantlets *in vitro* after 60 days of storage.

---

\*Guidance Committee: Prof. Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida – UFCG/CCT (Orientador), Dra. Julita Maria Frota Chagas Carvalho – EMBRAPA/CNPA, Prof<sup>a</sup>. Dra. Riselane de Lucena Alcântara Bruno – UFPB/CCA.



### 3 INTRODUÇÃO

A mamoneira é uma planta euforbiácea, com ampla distribuição no País, ocorrendo em todas as regiões e se vem destacando como ótima alternativa de exploração para o semi-árido brasileiro, em função da capacidade de resistir à seca e produzir com rentabilidade, segundo Beltrão *et al.* (2003); as perspectivas aumentam com a possibilidade do óleo da mamona ser matéria prima para a produção de biodiesel, garantindo a geração de emprego e renda para a região, porém incentivos por parte do governo e disponibilidade de cultivares com características adequadas são ainda necessários.

Com a pesquisa, busca-se obter cultivares cada vez mais adaptadas às condições existentes, apresentando porte adequado, alta produtividade, frutos semi-indescentes e sementes grandes, com elevado teor de óleo. Para isto, considerável diversidade de genes é conveniente nos programas de melhoramento vegetal, a qual pode ser obtida nos bancos de germoplasma da espécie (VIEIRA, 2000).

A metodologia convencional de conservação dos recursos genéticos inclui a coleção de germoplasma sementes (4 a 7% teor de água a -20°C), exigindo espaço apropriado e avaliações periódicas da sua viabilidade ou, ainda, conservação em condições de campo, o qual se apresenta muito laborioso e constantemente exposto a desastres climáticos e biológicos, podendo levar a perda total da coleção de germoplasma (NÓBREGA *et al.*, 2001 e SANTOS *et al.*, 2002).

Segundo Leite (2004), a partir de 1999 se desenvolveu grande esforço para enriquecer a variabilidade do banco de germoplasma de oleaginosas, em geral, e de mamona, em particular, conservadas no País. O armazenamento a longo prazo de sementes de oleaginosas é dificultado em função de inúmeros mecanismos importantes estarem associados ao processo de deterioração, como peroxidação de lipídios, acúmulo de substâncias, redução na atividade enzimática, na síntese protéica e na atividade respiratória (BRACCINI *et al.*, 2001).

Para superar as dificuldades na conservação dos recursos genéticos vegetais, estudos na área biotecnológica têm sido intensificados. Dentre as muitas técnicas, destaca-se a criopreservação, que envolve a manutenção de

material biológico sob temperaturas ultra-reduzidas, geralmente em nitrogênio líquido (-196°C), com potencial para garantir a conservação à longo prazo do germoplasma de espécies problemáticas, sanar a desvantagem econômica dos bancos de germoplasma convencionais e evitar a erosão genética das espécies vegetais (KARTHA, 1985). A estas temperaturas, reações metabólicas e deterioração biológica ocorrem muito lentamente ou são completamente suspensas, com o que se assegura, em teoria, sua conservação indefinidamente (STANWOOD, 1984 e STANWOOD, 1985).

Segundo Stanwood e Bass (1981) e Vertucci (1989), inúmeros fatores exercem influência na criopreservação e devem ser levados em consideração, como: teor de água, tamanho e anatomia da estrutura a ser conservada e as velocidades de resfriamento ou congelamento e reaquecimento ou descongelamento. Dentre os muitos fatores que exercem influência na criopreservação, o teor de água da estrutura a ser conservada é, provavelmente, o mais crítico fator para o sucesso da técnica, sendo assim, se a umidade é elevada, observar-se-á morte instantânea das células durante o processo de congelamento e/ou descongelamento (Cunha, 1996).

Diversas estruturas podem ser criopreservadas (sementes, ápices e gemas, embriões somáticos e zigóticos, células, protoplastos, etc.) contudo, é preciso otimizar protocolos visando garantir a regeneração de plantas inteiras, a partir das estruturas criopreservadas (SAKAI, 1995; STUSHNOFF e SEUFFERHELD, 1995; YONGJIE *et al.*, 1997). Henshaw *et al.* (1980) informam que, embora seja possível criopreservar várias partes da planta, os sistemas organizados, como sementes e embriões, são os mais adequados para a conservação de recursos genéticos.

Almeida *et al.* (2002) estudaram um protocolo de crioconservação de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) das variedades Nordeste e Pernambucana, a fim de garantir a conservação dos recursos genéticos desta espécie, a partir do qual, constataram que o nível máximo de umidade para criopreservação dessas sementes se encontra entre 4 a 10% (b.u.), podendo, então, serem criopreservadas, tanto no vapor (-176°C) como na imersão (-196°C) em nitrogênio líquido, utilizando-se canister de alumínio. Os autores destacaram, ainda, diferenças na qualidade fisiológica entre as sementes das variedades estudadas atribuindo-as, possivelmente, à sua composição química e/ou

sensibilidade a danos físicos. Iriondo *et al.* (1992) afirmam que não está claro a existência de uma correlação entre a sensibilidade das sementes com a criopreservação e seu conteúdo de óleo; no entanto Almeida *et al.* (2000) esclarecem que sementes com maior conteúdo de óleo parecem ser mais susceptíveis à criopreservação. Levando-se em consideração que o endosperma da semente de mamona, segundo Street e Opik (1974), contém cerca de 64% de óleo, a possibilidade de preservar seu embrião ou eixo embrionário, poderia superar as dificuldades na criopreservação desta espécie.

Na atualidade, a criopreservação de eixos embrionários pode ser a metodologia mais apropriada para a conservação a longo prazo, da diversidade genética de várias espécies problemáticas ou de difícil conservação, por se tratar de uma estrutura de tamanho reduzido, ocupando o mínimo espaço possível no armazenamento e por tolerar condições que seriam letais para a semente inteira (STUSHNOFF e SEUFFERHELD, 1995; YONGJIE *et al.*, 1997; BERJAK *et al.* 2000), além de eliminar a possível presença de microrganismos no armazenamento, os quais reduzem consideravelmente a germinação das sementes (MOSHKIN, 1986).

Santos *et al.* (2002) avaliaram a criopreservação de eixos embrionários zigóticos de café (*Coffea arabica* L.) constatando que eixos que apresentaram 12,6% de umidade, permaneceram viáveis após criopreservação. Faiad *et al.* (2004) informam que eixos embrionários podem tolerar teores de umidade por volta de 12% e subsequente congelamento em nitrogênio líquido e resgatados, após criopreservação, usando a cultura de tecidos, sendo que deles se originam plantas inteiras.

Avaliando a regeneração *in vitro* da mamoneira a partir de diferentes tipos de explante, Rocha *et al.* (2003) afirmaram ser o eixo embrionário o melhor explante para tal processo, por apresentar menor contaminação por fungos, em detrimento do emprego da semente inteira ou quebrada. Ribeiro *et al.* (2004) afirmaram ser possível regenerar acessos do banco ativo de germoplasma de mamona através do eixo embrionário, usando-se a técnica de cultura de tecidos *in vitro*.

Ante o abordado, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de definir um protocolo de extração e dessecação de eixos embrionários de sementes de mamoneira, seu efeito imediato e ao longo do armazenamento

criogênico, sobre sua capacidade de regeneração *in vitro*, a fim de assegurar a conservação *ex situ*, para usos futuros.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material vegetal e procedimentos iniciais**

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Centro Nacional de Pesquisa do Algodão (Embrapa-Algodão), em Campina Grande, PB. Utilizaram-se sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.), cultivares BRS 149 - Nordeste e BRS 188 - Paraguaçu, colhidas em campos de produção da Embrapa-Algodão, no município de Barbalha, CE, no ano agrícola de 2002/2003.

Antes do procedimento que se segue, as sementes com germinação inicial, em torno de 90%, para ambas as cultivares, foram padronizadas quanto ao seu teor de umidade empregando-se a fórmula proposta por Almeida *et al.* (1997) para promover a perda ou o ganho de água pelas sementes, até o teor permitido para a crioconservação, que é de 4 a 10%, de acordo com Almeida *et al.* (2002). Procedeu-se à esterilização das sementes em solução de hipoclorito de sódio comercial (Brluix) a 100% (v/v), com 2,5% de cloro ativo, acrescida com 1-2 gotas de polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween-20<sup>®</sup>), sob agitação por 20 minutos, seguida de tríplice lavagem em água bidestilada esterilizada.

Na obtenção dos eixos embrionários, sentiu-se a necessidade de avaliar o procedimento prévio de embebição das sementes, uma vez que, segundo Mazzani (1983), há variação quanto à proporção do tegumento e sua aderência ao endosperma, dependendo da variedade, o que poderá dificultar o procedimento de extração dos eixos embrionários das sementes desta espécie; por outro lado, a permanência das sementes por determinado período em embebição, poderá promover maior conteúdo de umidade nas mesmas e, conseqüentemente, em suas estruturas, o que poderá refletir na sua crioconservação.

Sendo assim, o presente trabalho foi realizado em duas etapas distintas nas quais se determinou, de início, a melhor forma de obtenção dos eixos embrionários e, numa segunda, seu comportamento no armazenamento, em nitrogênio líquido.

## **4.2 Obtenção dos eixos embrionários**

Após esterilização, uma parte das sementes foi mantida em água bidestilada esterilizada (embebição), durante 24 horas, para posterior extração dos eixos embrionários e outra parte foi submetida imediatamente a extração, em câmara de fluxo laminar.

Os eixos embrionários de sementes embebidas e não embebidas foram submetidos a dessecação em ar estéril, por 0, 30, 60 e 90 minutos, na câmara de fluxo laminar, sob temperatura ambiente de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  sendo, em seguida, colocados em recipientes estéreis de polipropileno de 4,5 mL (quatro réplicas de 10 eixos embrionários por frasco) e imersos diretamente no nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , permanecendo cinco dias.

O teor de água dos eixos embrionários submetidos aos diferentes períodos de dessecação, foi determinado através da pesagem do tecido e secagem em estufa regulada a  $103\pm 2^{\circ}\text{C}$ , durante 17 horas, conforme recomendado pela International Seed Testing Association – ISTA (1985), empregando-se três repetições de 30 eixos. O teor de água foi expresso em porcentagem, com base no peso fresco.

Após o período de criopreservação, foram retirados e postos para descongelar sob temperatura ambiente, por 60 minutos; posteriormente, foram cultivados em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, contendo meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), devidamente vedados e mantidos em câmara de crescimento, regulada a temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 16/8 horas (claro/escuro) e intensidade luminosa em torno de  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  proporcionada por lâmpadas fluorescentes brancas frias. As avaliações foram realizadas semanalmente, até o 30<sup>o</sup> dia após cultivo, mediante a porcentagem de regeneração, a mensuração do comprimento de plântulas e contagem do número de raízes emitidas.

### **4.2.1 Procedimento estatístico**

Os dados foram analisados segundo o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial  $2 \times 2 \times 4 \times 2$ , sendo duas cultivares (Nordestina e Paraguaçu), duas formas de obtenção dos eixos embrionários (sementes embebidas e não embebidas), quatro tempos de dessecação (0, 30, 60 e 90 minutos) e duas condições de avaliação (eixos crioconservados e não

crioconservados). Procedeu-se à análise de variância dos dados obtidos, com comparações de médias das cultivares estudadas, realizada pelo teste de Tukey a 5% e desdobramento da variável quantitativa em parâmetros de regressão polinomial. Antes da análise, os dados referentes ao comprimento de plântulas foram transformados para  $\sqrt{X+1}$ .

### **4.3 Criopreservação**

Na avaliação da criopreservação, sementes de mamoneira devidamente esterilizadas e embebidas 24 horas em água bidestilada e esterilizada, foram submetidas a extração de seus eixos embrionários, em câmara de fluxo laminar.

Os eixos embrionários obtidos foram submetidos a dessecação em ar estéril, pelo tempo de 0, 30, 60 e 90 minutos e, em seguida, colocados em recipientes estéreis de polipropileno de 4,5 mL (quatro réplicas de 10 eixos por frasco) e imersos diretamente no nitrogênio líquido, a  $-196^{\circ}\text{C}$ , aí permanecendo 0, 5, 30 e 60 dias.

Separaram-se três repetições de 30 eixos embrionários, após cada período de dessecação, para a determinação do teor de água, no momento de sua criopreservação, seguindo-se recomendações da ISTA (1985). O teor de água foi expresso em porcentagem, com base no peso fresco.

Após cada período de criopreservação, os recipientes contendo os eixos embrionários foram retirados do nitrogênio líquido e postos para descongelar sob temperatura ambiente por 60 minutos e, posteriormente, cultivados em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, contendo meio MS e mantidos em câmara de crescimento em condições semelhantes ao citado anteriormente. Realizaram-se avaliações no 30<sup>o</sup> dia após cultivo, com base na porcentagem de regeneração, mensuração do comprimento de plântulas e contagem do número de raízes emitidas.

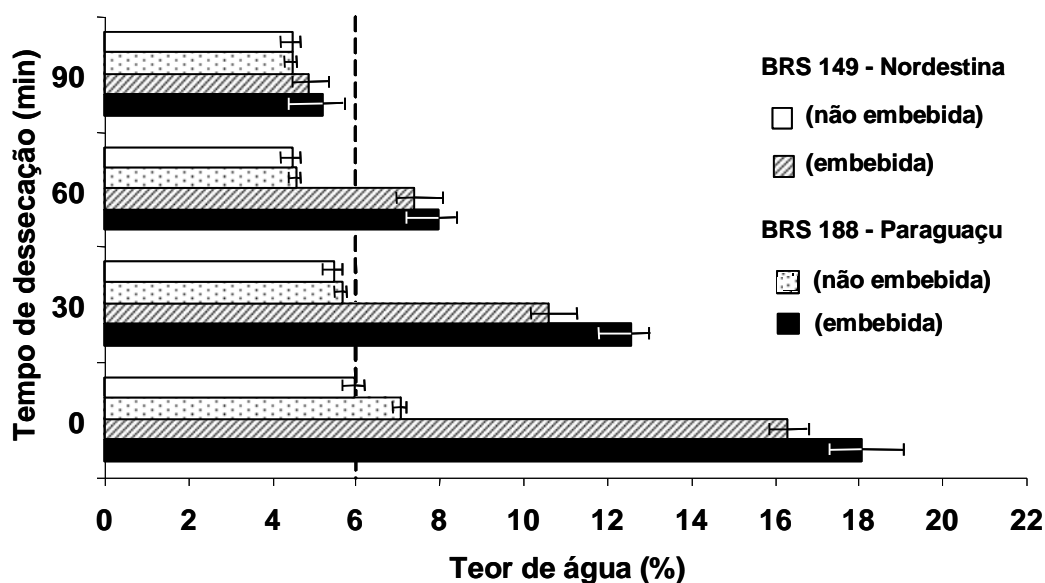
#### **4.3.1 Procedimento estatístico**

Os dados foram analisados segundo o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 x 4, sendo duas cultivares (Nordestina e Paraguaçu), quatro tempos de dessecação (0, 30, 60 e 90 minutos) e quatro períodos de armazenamento dos eixos embrionários (0, 5, 30 e 60 dias), procedendo-se à análise de variância e regressão polinomial, para cada cultivar,

em função do tempo de dessecação e do período de armazenamento, utilizando-se dos modelos de superfícies de resposta, selecionando aquele em que todas as variáveis do modelo apresentaram contribuição significativa.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de água dos eixos embrionários de sementes da mamoneira, empregados no presente estudo encontra-se na Figura 1 na qual se observa que eixos embrionários apresentaram teor de água inicial, em média de 17% e 6,5%, quando extraídos de sementes com e sem embebição, respectivamente, em ambas as cultivares estudadas; quando submetidos a dessecação, ocorreu redução no teor de água dos eixos embrionários em decorrência do seu tempo de exposição ao fluxo laminar contínuo de ar, atingindo cerca de 5% após 90 minutos de dessecação porém, para os eixos extraídos de sementes não embebidas, de ambas as cultivares, o teor de água dos mesmos foi inferior a 6%, atingindo, aos 30 minutos de dessecação, 4,5% após dessecação pelo tempo de 90 minutos (Figura 1). O menor teor de água nos eixos obtidos de sementes sem embebição, de imediato, os torna os ideais para se proceder a criopreservação, uma vez que, a água é fator limitante em tal prática, contudo, a extração de eixos embrionários em sementes de mamona não embebidas é dificultada em função de seus tecidos encontrarem-se muito secos e quebradiços, demandando maior tempo e quantidade de material para extração. Em contraste aos resultados obtidos, Santos *et al.* (2002) estudando a criopreservação de eixos embrionários de café (*Coffea arabica* L.) determinaram a umidade das sementes, alegando não ser possível determinar a umidade dos eixos embrionários pelo fato, dos mesmos, serem removidos das sementes após estas terem permanecido por um período mínimo de 48 horas em embebição para amolecimento do endosperma, contudo, enfatizam a importância em se determinar o teor de água dos eixos embrionários.



**Figura 1.** Teor de água, em porcentagem, de eixos embrionários oriundos de sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.) cultivares BRS 149 - Nordestina e BRS 188 - Paraguaçu, com e sem embebição em água por 24 horas e dessecadas em câmara de fluxo laminar. Barras representam a média de três réplicas em cada tratamento.

### 5.1 Obtenção dos eixos embrionários

A análise de variância (Apêndice 1D) evidenciou valores significativos de regeneração e número de raízes emitidas de eixos embrionários, na maioria das variáveis estudadas, excetuando a interação dupla entre cultivar x embebição. No que se refere ao comprimento de plântulas, só houve efeitos significativos para as variáveis isoladas, cultivar e dessecação, para as interações duplas em que a embebição esteve presente, assim como para dessecação x armazenamento e para interação tripla entre embebição x dessecação x armazenamento.

Eixos embrionários de mamona apresentaram valores de regeneração *in vitro*, após crioconservação por cinco dias, na ordem de 89,22 e 87,03%, para as cultivares Nordestina e Paraguaçu, respectivamente, com diferenças significativas entre elas (Tabela 1). Comportamento semelhante foi verificado para o comprimento de plântulas e o número de raízes emitidas por eixos embrionários, com destaque para a cultivar BRS 149 - Nordestina; no entanto, quando se compara o valor absoluto individual dessas médias, constata-se que não há diferença marcante entre elas, levando-se a crer, que a diferença se deve, provavelmente, ao patrimônio genético de cada cultivar, não havendo em, valores absolutos, efeito da criopreservação sobre a viabilidade dos eixos embrionários



das cultivares estudadas. Este comportamento foi observado por Almeida *et al.* (2002) depois de submeterem sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.), das variedades Nordeste e Pernambucana, à criopreservação, por três dias; do mesmo modo que Batista (2000) observou em gergelim (*Sesamum indicum* L.), depois de criopreservar suas sementes por cinco dias.

**Tabela 1.** Valores médios de regeneração, comprimento de plântula e número de raízes emitidas por eixos embrionários de duas cultivares de mamoneira (*Ricinus communis* L.), após criopreservação em nitrogênio líquido a (-196°C), durante cinco dias.

Fator	Regeneração (%)	Comprimento de Plântula <sup>1</sup> (cm)	Número de Raízes Emitidas
Cultivares			
Nordestina	89,22 a	5,17 a	7,67 a
Paraguaçu	87,03 b	3,92 b	7,26 b
DMS	1,65	0,17	0,30

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A regeneração de eixos embrionários não apresentou diferenças significativas quando extraídos de sementes de mamoneira das cvs. BRS 188 - Paraguaçu e BRS 149 – Nordeste, com e sem embebição em água bidestilada e não submetidas a criopreservação, mantendo a viabilidade em torno dos 100%, independente do tempo em que permaneceram na câmara de fluxo laminar para secagem (Tabela 2 e 3 e Figura 2); já a regeneração dos eixos embrionários criopreservados, extraídos de sementes previamente embebidas em água, foi inferior quando comparada às dos eixos extraídos de sementes que não foram embebidas (Tabela 2 e 3). A dessecação por período superior a 60 minutos, dos eixos embrionários de sementes embebidas, foi a que melhor favoreceu a regeneração (Figura 2), momento em que se observou teor de água, dos mesmos, em torno de 6% (Figura 1). Os menores valores de regeneração dose eixos embrionários de mamona, coincidem com o maior teor de água em suas células, indicando que possivelmente ocorreram danos nas células devido ao congelamento da água livre contida na solução intracelular das membranas. Sobre o tema, Santos (200) afirma que para evitar tais danos se faz necessário reduzir o teor de água livre nas células para garantir sucesso na criopreservação; contudo, Leonhardt *et al.* (1984), enfatizam que o processo de dessecação uma

vez que a desidratação intensa remove água de ligação ou sub-celular, alterando sua conformação e configuração molecular, bem como provocando rupturas nas membranas dos tonoplasto e plasmalema. Tais resultados encontram apoio no trabalho de Santos *et al.* (2002) crioconservando eixos embrionários zigóticos de *Coffea arabica* L.

**Tabela 2.** Valores médios de regeneração de eixos embrionários de mamoneira (*Ricinus communis* L.) cultivar BRS 188 - Paraguaçu, extraídos de sementes embebidas (c/emb) e não embebidas (s/emb) em água e, submetidos a dessecação e imersão em nitrogênio líquido (-196°C), durante cinco dias.

	Tempo de dessecação (minutos)							
	0		30		60		90	
	- NL	+ NL	- NL	+ NL	- NL	+ NL	- NL	+ NL
<b>s/emb</b>	100,0 aA	75,0 aB	97,5 aA	97,5 aA	97,5 aA	97,5 aA	95,0 aA	100,0 aA
<b>c/emb</b>	100,0 aA	0,0 bB	100,0 aA	70,0 bB	100,0 aA	62,5 bB	100,0 aA	100,0 aA

Em cada tempo de dessecação, médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

DMS Linha e coluna = 6,64

- NL = não submetido a imersão em nitrogênio líquido

+ NL = submetido a imersão em nitrogênio líquido

**Tabela 3.** Valores médios de regeneração de eixos embrionários de mamoneira (*Ricinus communis* L.) cultivar BRS 149 - Nordestina, extraídos de sementes embebidas (c/emb) e não embebidas (s/emb) em água e, submetidos a dessecação e imersão em nitrogênio líquido (-196°C), durante cinco dias.

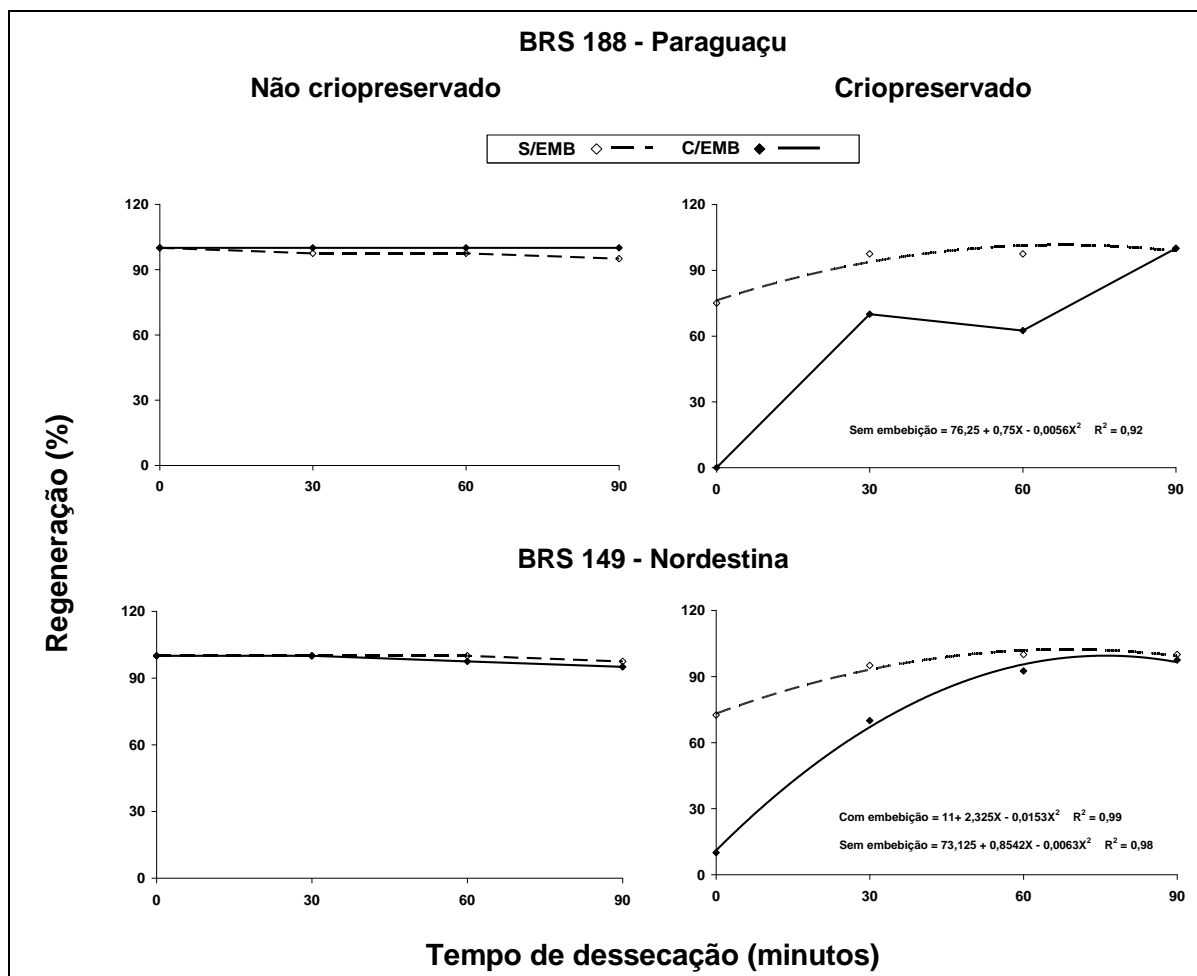
	Tempo de dessecação (minutos)							
	0		30		60		90	
	- NL	+ NL	- NL	+ NL	- NL	+ NL	- NL	+ NL
<b>s/emb</b>	100,0 aA	72,5 aB	100,0 aA	95,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	97,5 aA	100,0 aA
<b>c/emb</b>	100,0 aA	10,0 bB	100,0 aA	70,0 bB	97,5 aA	92,5 bA	95,0 aA	97,5 aA

Em cada tempo de dessecação, médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

DMS Linha e coluna = 6,64

- NL = não submetido a imersão em nitrogênio líquido

+ NL = submetido a imersão em nitrogênio líquido



**Figura 2.** Porcentagem de regeneração de eixos embrionários dessecados e criopreservados a  $-196^{\circ}\text{C}$ , por cinco dias, oriundos de sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.) com e sem embebição por 24 horas.

Não se constatou variação no comprimento de plântulas regeneradas *in vitro*, a partir de eixos embrionários obtidos de sementes de mamoneira embebidas e não embebidas 24 horas e que não foram submetidos ao nitrogênio líquido (Tabela 4); observa-se, porém, em valores absolutos, a superioridade no comprimento de plântulas originadas de eixos embrionários de sementes embebidas (Figura 3). Esta superioridade é, possivelmente, resultante da retomada de crescimento do eixo embrionário, no momento em que a semente absorve água, como consequência do aumento da atividade metabólica das células, de acordo com Carvalho e Nakagawa (2000).

Eixos embrionários extraídos de sementes embebidas e submetidos a criopreservação, apresentaram maior comprimento de plântulas sempre que se aumentou o período de permanência dos mesmos sob dessecação (Figura 3), em razão de apresentarem um conteúdo de água menor, em suas células, menos de

6% aos 90 minutos de dessecação (Figura 1), período em que ocorreu superação no comprimento de plântulas originadas de eixos embrionários de sementes embebidas (Figura 3 e Tabela 4); por outro lado, eixos embrionários extraídos de sementes embebidas e não dessecados, não suportaram a criopreservação. Os resultados evidenciam a importância do teor de água dos eixos embrionários e sua tolerância à temperatura do nitrogênio líquido (-196°C), estando de acordo com González-Benito *et al.* (1998) onde, estudando a criopreservação de eixos embrionários de algodoeiro cvs. CNPA 4M, CNPA 5M, CNPA Precoce 1, CNPA Precoce 2 e Coker 312, verificaram que eixos embrionários não dessecados e congelados não germinaram em função do elevado conteúdo de água em suas células.

**Tabela 4.** Valores médios de comprimento de plântulas originadas de eixos embrionários de mamoneira (*Ricinus communis* L.), extraídos de sementes embebidas (c/emb) e não embebidas (s/emb) em água e, submetidos a dessecação e imersão em nitrogênio líquido (-196°C), durante cinco dias.

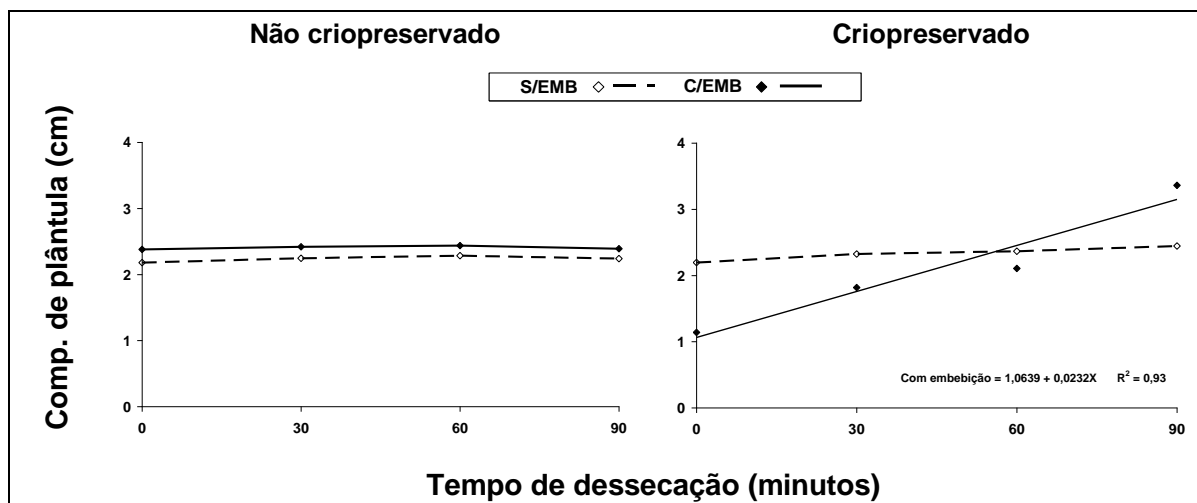
	Tempo de dessecação (minutos)							
	0		30		60		90	
	- NL	+ NL	- NL	+ NL	- NL	+ NL	- NL	+ NL
<b>s/emb</b>	2,18 aA	2,20 aA	2,25 aA	2,32 aA	2,28 aA	2,36 aA	2,24 aA	2,44 bA
<b>c/emb</b>	2,38 aA	1,14 bB	2,41 aA	1,82 bB	2,44 aA	2,11 aA	2,39 aB	3,36 aA

Em cada tempo de dessecação, letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

DMS Linha e coluna = 0,47

- NL = não submetido a imersão em nitrogênio líquido

+ NL = submetido a imersão em nitrogênio líquido



**Figura 3.** Comprimento de plântulas originadas de eixos embrionários dessecados e criopreservados a  $-196^{\circ}\text{C}$ , por cinco dias, oriundos de sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.) com e sem embebição por 24 horas.

De modo geral, eixos embrionários de mamoneira, extraídos de sementes com e sem embebição em água destilada por 24 horas, quando não submetidos a criopreservação (Tabela 5), não diferiram quanto ao número de raízes emitidas por plântulas regeneradas, excetuando-se aqueles da cv. BRS 188 – Paraguaçu, quando dessecados por 90 minutos, cujos eixos embrionários de sementes embebidas apresentaram maior número de raízes; enquanto eixos criopreservados apresentaram pouca ou nenhuma raiz, principalmente para aqueles com maior teor de água (Figura 1), o que se deu com eixos embrionários obtidos de sementes embebidas, não dessecados, de ambas cultivares (Tabela 5 e 6 e Figura 4) ou dessecados por 30 minutos para cv. BRS 188 - Paraguaçu (Tabela 5 e Figura 4). A capacidade que os eixos embrionários criopreservados apresentam em emitir um maior número de raízes indica que não houve danos a nível celular, garantindo desta forma a manutenção do seu vigor após criopreservação, fator este, diretamente dependente do teor de água que continham ao serem imersos no nitrogênio líquido, o que vem a concordar com Raja *et al.* (2003), que não obtiveram sobrevivência, após criopreservação, em eixos embrionários de *Areca cacetu* L. dessecados por 0 e 1 hora, devido o elevado teor de água (>52%).

**Tabela 5.** Valores médios de número de raízes emitidas por eixos embrionários de mamoneira (*Ricinus communis* L.) cultivar BRS 188 - Paraguaçu, extraídos de sementes embebidas (c/emb) e não embebidas (s/emb) em água e, submetidos a dessecação e imersão em nitrogênio líquido (-196°C), durante cinco dias.

	Tempo de dessecação (minutos)							
	0		30		60		90	
	- NL	+ NL	- NL	+ NL	- NL	+ NL	- NL	+ NL
<b>s/emb</b>	7,5 aA	7,8 aA	7,6 aA	8,4 aA	8,2 aA	9,1 aA	6,9 bB	9,3 bA
<b>c/emb</b>	8,1 aA	0,0 bB	8,5 aA	0,7 bB	8,9 aA	5,7 bB	8,7 aB	10,6 aA

Em cada tempo de dessecação, médias seguidas pela mesma letra minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

DMS Linha e coluna = 1,21

- NL = não submetido a imersão em nitrogênio líquido

+ NL = submetido a imersão em nitrogênio líquido

**Tabela 6.** Valores médios de número de raízes emitidas por eixos embrionários de mamoneira (*Ricinus communis* L.) cultivar BRS 149 - Nordestina, extraídos de sementes embebidas (c/emb) e não embebidas (s/emb) em água e, submetidos a dessecação e imersão em nitrogênio líquido (-196°C), durante cinco dias.

	Tempo de dessecação (minutos)							
	0		30		60		90	
	- NL	+ NL	- NL	+ NL	- NL	+ NL	- NL	+ NL
<b>s/emb</b>	7,2 aA	7,2 aA	7,7 aA	8,3 aA	8,1 aB	9,6 aA	8,2 aB	9,7 aA
<b>c/emb</b>	7,9 aA	0,1 bB	7,4 aA	6,2 bB	8,5 aA	7,7 bA	8,7 aB	10,0 aA

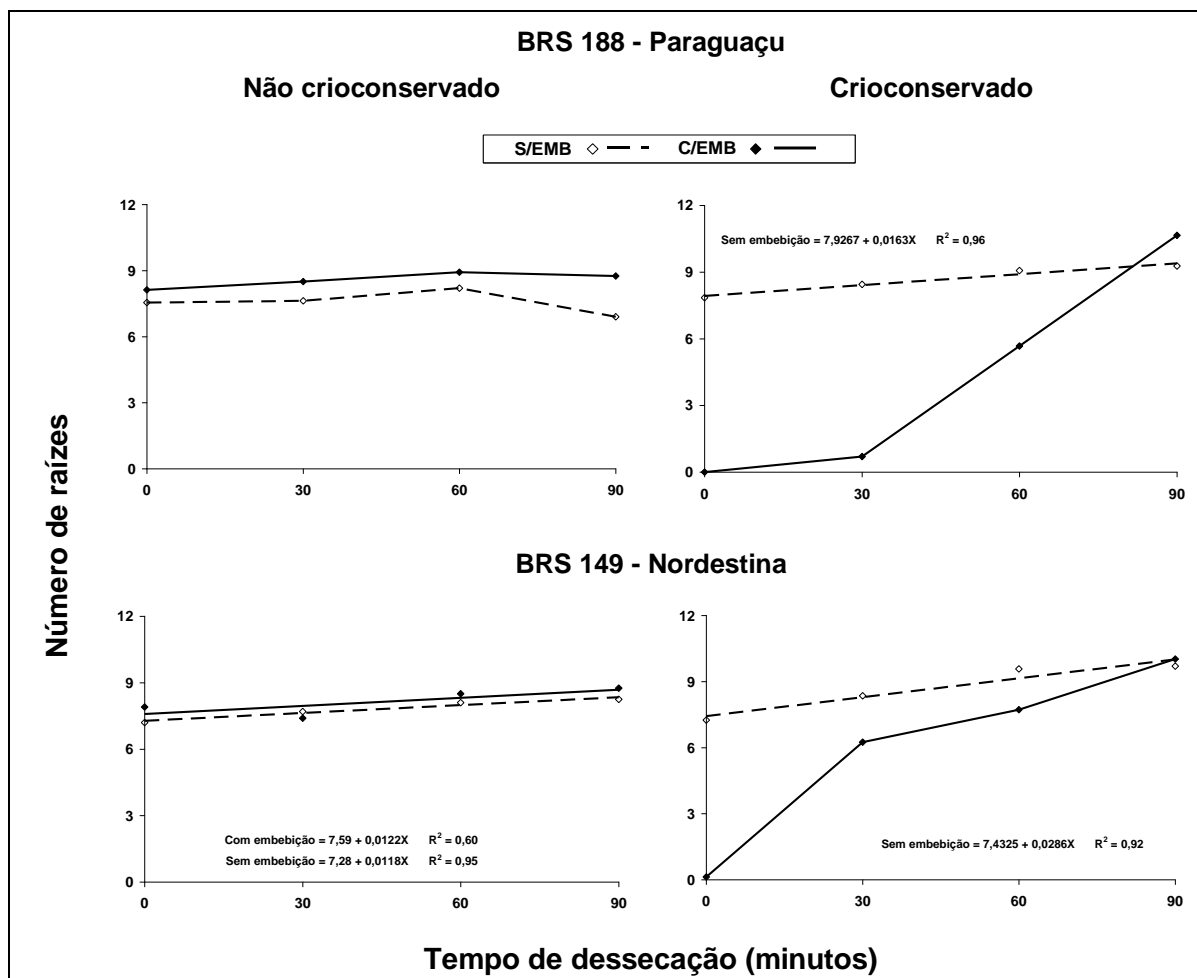
Em cada tempo de dessecação, médias seguidas pela mesma letra minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

DMS Linha e coluna = 1,21

- NL = não submetido a imersão em nitrogênio líquido

+ NL = submetido a imersão em nitrogênio líquido

Após criopreservação de eixos embrionários extraídos de sementes embebidas em água por 24 horas, a viabilidade se encontra em função do tempo em que os mesmos permanecem em dessecação. Esta prática, quando realizada de forma apropriada, parece acelerar a reativação das atividades metabólicas das células durante a regeneração dos eixos embrionários cultivados *in vitro*. Quanto aos eixos embrionários extraídos de sementes não embebidas e apesar de não haver dificuldades na preservação da viabilidade, durante criopreservação, sua extração não ocorre facilmente, em virtude das estruturas das sementes (tegumento e endosperma) se encontrarem muito secas ocorrendo, em muitos casos, danos aos eixos embrionários durante tal procedimento, o que poderá comprometer sua criopreservação.



**Figura 4.** Número de raízes por plântulas originadas de eixos embrionários dessecados e criopreservados a  $-196^{\circ}\text{C}$ , por cinco dias, oriundos de sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.) com e sem embebição por 24 horas.

## 5.2 Criopreservação

Pela análise de variância (Apêndice 1E), observaram-se diferenças significativas para a porcentagem de regeneração, comprimento de plântula e número de raízes emitidas pelos eixos embrionários de mamoneira, na maioria das variáveis estudadas, com exceção da variável cultivar, sobre a porcentagem de regeneração e da interação entre todas variáveis no comprimento de plântula.

Nota-se na Tabela 7, mais uma vez, a superioridade estatística da cv. BRS 149 – Nordestina, sobretudo no que se refere ao comprimento de plântulas e ao número de raízes emitidas pelos seus eixos embrionários, excetuando-se a porcentagem de regeneração, na qual, superou apenas em valores absolutos a cv. BRS 188 - Paraguaçu. Na realidade, este fato está mais associado ao valor

genético inicial de cada cultivar que qualquer outra influência de técnicas da criopreservação ou período de armazenagem. Sobre o tema, Almeida *et al.* (2000) esclarecem que diferenças entre variedades pode ser devido, à sua composição química e/ou sensibilidade a danos físicos.

**Tabela 7.** Valores médios de regeneração, comprimento de plântula e número de raízes emitidas por eixos embrionários de duas cultivares de mamoneira (*Ricinus communis* L.), submetidos a dessecação e criopreservação em nitrogênio líquido (-196°C).

Fator	Regeneração (%)	Comprimento de Plântula <sup>1</sup> (cm)	Número de Raízes Emitidas
Cultivares			
Nordestina	70,31 a	3,86 a	6,16 a
Paraguaçu	69,06 a	3,27 b	5,48 b
DMS	2,14	0,16	0,29

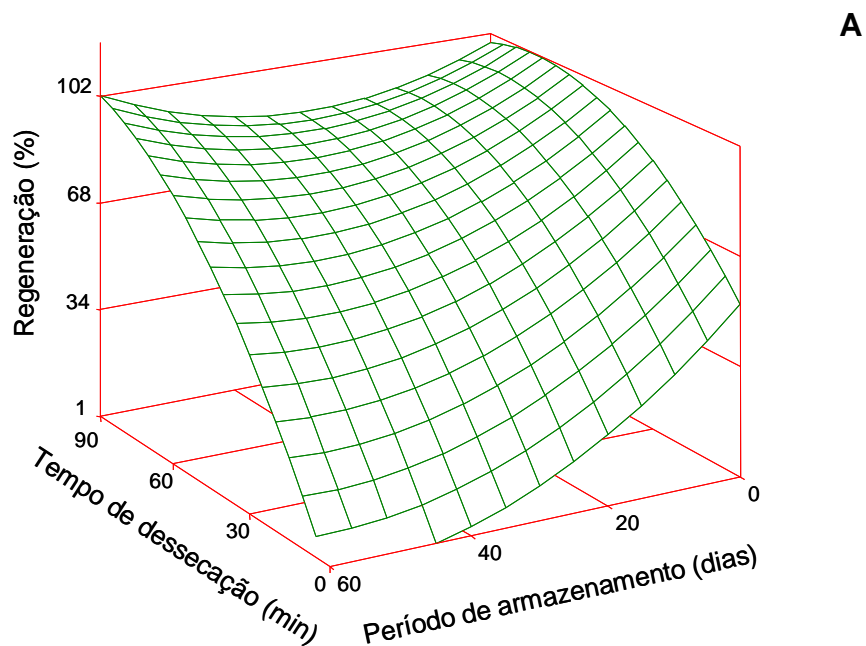
Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A regeneração de eixos embrionários de mamoneira submetidos a criopreservação, variou em função do tempo de sua dessecação em câmara de fluxo laminar e do período de armazenamento (Figura 5, A e B). Este fato está diretamente relacionado com o teor de água que os eixos continham ao serem imersos no nitrogênio líquido (Figura 1). A criopreservação dos eixos embrionários dessecados 90 minutos em câmara de fluxo laminar (5,1% do teor de água) manteve a viabilidade dos mesmos em níveis elevados (superior a 80%) até o final do período de armazenamento, sendo superior estatisticamente aos que foram dessecados 30 minutos (11,6% do teor de água), em ambos os materiais estudados (Figura 5, A e B). A dessecação inferior a 30 minutos não permitiu que os eixos atingissem o teor de água limite para sua criopreservação, que parece estar entre 4 e 7%, ocorrendo morte do tecido ou má formação de plântulas originadas de tais eixos embrionários, por consequência da formação de cristais de gelo no meio intracelular, estando de acordo com Santos (2001). Conforme se observa, mediante tais resultados, a umidade dos eixos embrionários no momento da criopreservação é ponto de partida para o sucesso de tal prática. É oportuno destacar o efeito da manutenção do material em condições de temperaturas ultra-reduzidas, sobre a sua integridade física e genética, requisitos básicos quando se pretende estabelecer um banco de germoplasma.



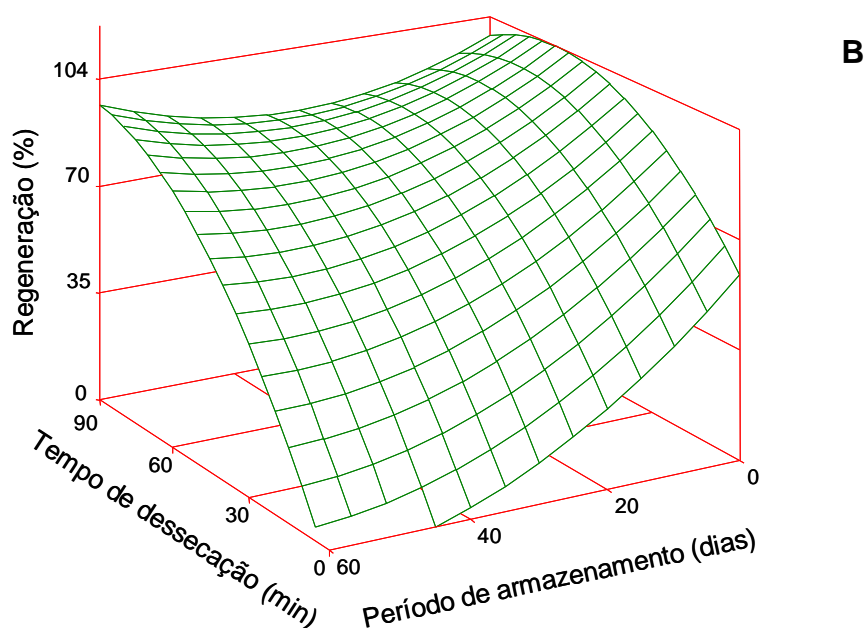
$$\text{Reg (\%)} = 53,3806 - 1,87465**p + 0,015706**p^2 + 1,31569**d - 0,0090278**d^2 + 0,0109183**pd$$

$$R^2 = 0,71$$



$$\text{Reg (\%)} = 58,4907 - 1,9747*p + 0,015002**p^2 + 1,400581**d + 0,0107639**d^2 + 0,0115978**pd$$

$$R^2 = 0,79$$



**Figura 5.** Porcentagem de regeneração de eixos embrionários de mamoneira (*Ricinus communis* L.) em função do tempo de dessecação em câmara de fluxo laminar e do período de armazenamento em nitrogênio líquido. (A) cultivar BRS 188 - Paraguaçu e (B) BRS 149 - Nordestina.

O comprimento de plântulas originadas dos eixos embrionários de mamona, apresentou comportamento semelhante ao verificado para a regeneração, havendo destaque para os eixos dessecados durante 90 minutos em câmara de fluxo laminar, os quais originaram maiores plântulas, independente do tempo de armazenamento em nitrogênio líquido (Figura 6, A e B), enquanto eixos dessecados por menos de 30 minutos não toleraram a criopreservação. Resultados semelhantes foram obtidos por Gonzáles-Benito *et al.* (1998) estudando a dessecação e a criopreservação de eixos embrionários de algodão, constataram que dessecação por período inferior a 30 minutos, em sílica gel, não garante regeneração aos eixos embrionários submetidos ao nitrogênio líquido.

Eixos embrionários de mamoneira, quando dessecados por período superior a 60 minutos em câmara de fluxo laminar, momento em que o teor de água se encontrava em torno de 7% (Figura 1), resistiram ao armazenamento em nitrogênio líquido, formando plântulas normais com considerável número de raízes, mantendo-se estáveis durante a criopreservação (Figura 7, A e B). Eixos embrionários, não dessecados ou dessecados por período inferior a 30 minutos, emitiram pouca ou nenhuma raiz após criopreservação, comportamento este mais evidente na cultivar BRS 188 - Paraguaçu (Figura 7, A). Os resultados encontram apoio nos relatos de Chandel *et al.* (1995), onde afirmam que os danos causados pelo frio dependem da espécie e do período de criopreservação.

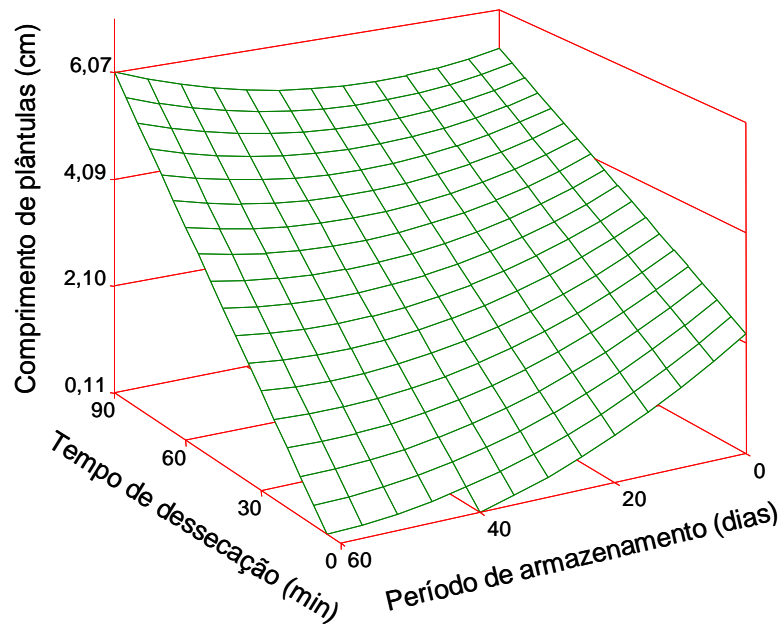
Segundo os resultados obtidos, eixos embrionários de mamoneira (*Ricinus communis* L.) podem ser criopreservados, adotando-se o congelamento rápido por meio da imersão direta dos mesmos no nitrogênio líquido (-196°C) e descongelados sob temperatura ambiente ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ), estando seu reestabelecimento, após criopreservação, dependente da sua dessecação prévia a teores de água toleráveis.

O presente protocolo de criopreservação de eixos embrionários de mamoneira é simples e não requer o uso de crioprotetores químicos ou congeladores programáveis.

A criopreservação de eixos embrionários é uma alternativa viável para a conservação a longo prazo de germoplasma de *Ricinus communis*.

$$\text{Comp (cm)} = 2,26613 - 0,0781964*p + 0,000605887*p^2 + 0,0338604*d + 0,000605877*pd$$

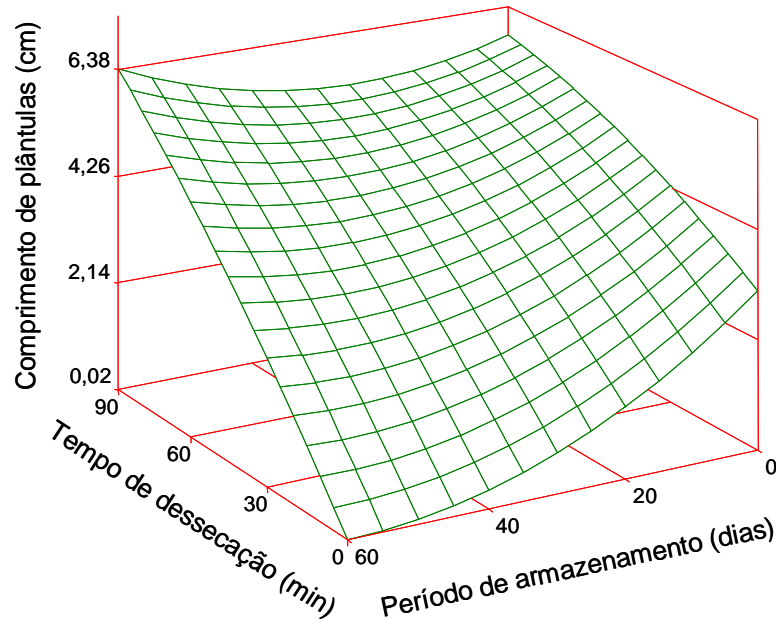
$$R^2 = 0,73$$



**A**

$$\text{Comp} = 3,07619 - 0,100929**p + 0,00083392**p^2 + 0,045446**d - 0,00173611**d^2 + 0,000675666**pd$$

$$R^2 = 0,79$$

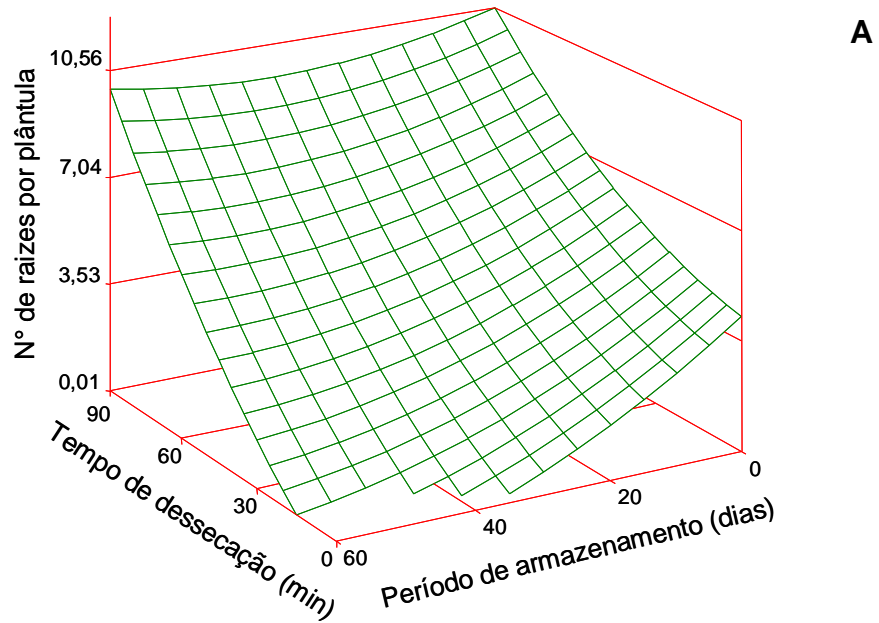


**B**

**Figura 6.** Comprimento de plântulas originadas de eixos embrionários de mamoneira (*Ricinus communis* L.) em função do tempo de dessecação em câmara de fluxo laminar e do período de armazenamento em nitrogênio líquido. (A) cultivar BRS 188 - Paraguaçu e (B) BRS 149 - Nordestina.

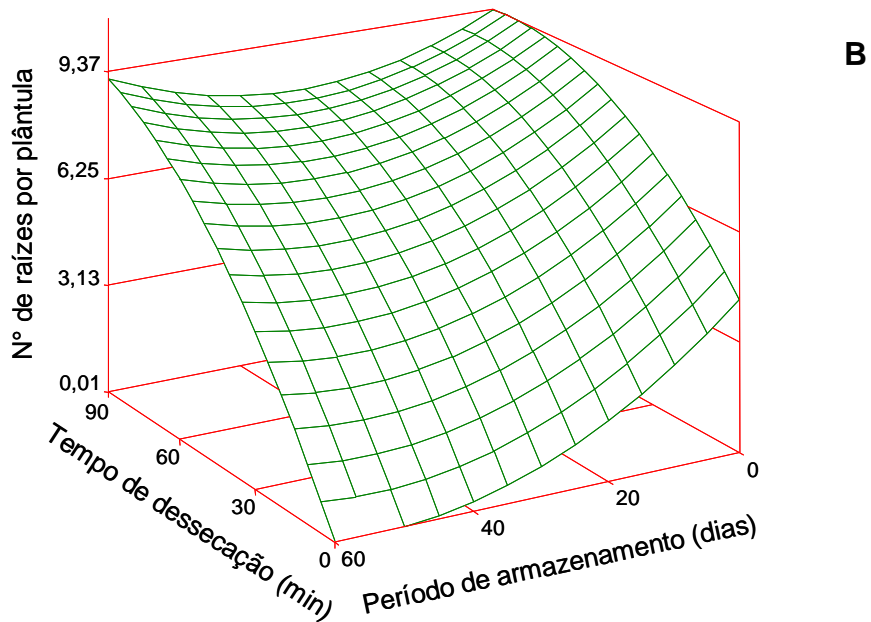
$$N_{raiz} = 4,31138 - 0,145323**p + 0,0087325**p^2 + 0,0220513**d + 0,000526043**d^2 + 0,00091933**pd$$

$$R^2 = 0,69$$



$$N_{raiz} = 4,32827 - 0,161721**p + 0,00150556**p^2 + 0,12071**d - 0,00722224**d^2 + 0,00759596**pd$$

$$R^2 = 0,80$$



**Figura 7.** Número de raízes emitidas de eixos embrionários de mamoneira (*Ricinus communis* L.) em função do tempo de dessecação em câmara de fluxo laminar e do período de armazenamento em nitrogênio líquido. (A) cultivar BRS 188 - Paraguaçu e (B) BRS 149 - Nordestina.

## 6 CONCLUSÕES

O teor de água limite recomendado para a crioconservação de eixos embrionários de mamoneira (*Ricinus communis* L.) está entre 4 a 7%;

Eixos embrionários, obtidos de sementes de mamoneira embebidas em água por 24 horas, devem ser dessecados durante 90 minutos em câmara de fluxo laminar, antes da criopreservação;

Eixos embrionários de mamoneira, contendo 5,1% de umidade, sobrevivem ao congelamento em nitrogênio líquido e regeneram mais de 80% de plântulas *in vitro* após 60 dias de armazenamento em nitrogênio líquido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F. de A.C.; MATOS, V.R.; CASTRO, J.R. de; DUTRA, A.S. Avaliação da qualidade e conservação de sementes a nível de produtor. In: ALMEIDA, F. de A.C.; HARA, T.; CAVALCANTI MATA, M.E.R.M. (ed.). **Armazenamento de grãos e sementes nas propriedades rurais**. Campina Grande: UFPB/SBEA, 1997, 201p.

ALMEIDA, F. de A.C.; PITA VILLAMIL, J.M.; GOUVEIA, J.P.G. de. Efecto de la crioconservación sobre la germinación de semillas de leguminosas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.2, n.1, p.67-71, 2000.

ALMEIDA, F. de A.C.; MORAIS, A.M. de; CARVALHO, J.M.F.C.; GOUVEIA, J.P.G. de. Crioconservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande, v.6, n.2, p.295-302, 2002.

BATISTA, R.C. **Cultivo *in vitro* e criopreservação de sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L.)**. Campina Grande: DEAg/CCT/UFPB, 2000, 83p. Dissertação Mestrado.

BELTRÃO, N.E. de M.; MELO, F.B.; CARDOSO, G.D.; SEVERINO, L.S. **Mamona: árvore do conhecimento e sistemas de produção para o semi-árido brasileiro**. Campina Grande, PB. Embrapa, 19p., 2003. (Circular Técnica, 70).

BERJAK, P.; WALKER, M.; MYCOCK, D.J.; WESLEY-SMITH, J.; WATT, P.; PAMMENTER, N.W. Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Japan/International; Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p.140-155.

BRACCINI, A.L.; BRACCINI, M.C.L.; SCAPIN, C.A. Mecanismos de deterioração das sementes: aspectos bioquímicos e fisiológicos. **Informativo ABRATES**. Londrina: ABRATES, v.11, n.1, p.10-15, 2001.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588p.

CHANDEL, K.P.S.; CHAUDHURY, R.; RADHAMANI, J. MALIK, S.K. Desiccation and freezing sensitivity in recalcitrant seed of tea, cocoa and jackfruit. **National Plant Tissue Culture Repository**, New Delhi, v.443-450, 1995.

CUNHA, R. da. Cultura de tecidos na conservação de germoplasma vegetal. In: PUIGNAU, J.P. **Conservación de Germoplasma Vegetal**. Montevideo: IICA, 1996. p.129-138. IICA-PROCISUR, Dialogo, 45.

FAIAD, M.G.R.; SALOMÃO, A.N.; SANTOS, I.R.I. **Estratégias e resultados da conservação de germoplasma-semente a longo prazo**.

<[http://www.giacometti.org.br/htm/artigo\\_exibe.cfm?\d=64](http://www.giacometti.org.br/htm/artigo_exibe.cfm?\d=64)> Acesso em: 25 de fevereiro 2004.

GIACOMETTI, D.C.; GOES, M. Conservação de Germoplasma de espécies frutíferas pelo uso da biotecnologia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.8, n.3, p.39-46, 1986.

GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; CARVALHO, J.M.F.C.; PÉREZ, C. Effect of desiccation and cryopreservation of embryonic axes and seeds of cotton. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.33, n.1, p.17-20, 1998.

HENSHAW, G.G.; STAMP, J.A.; WESTCOTT, J.J. Tissue cultures and germplasm storage. In: SALA, F.; PARISI, B.; CELLA, R.; CIFERRI, O. **Plant cell cultures: results and perspectives**. Amsterdam: Elsevier. 1980. p.277-282.

IRIONDO, J.M.; PEREZ, C.; PEREZ-GARCIA, F. Effect of seed storage in liquid nitrogen on germination of several crop and wild species. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.20, n.1, p.165-171, 1992.

ISTA, International rules for seed testing. **Seed Science and Technology**. v.13, n.2, p.299-355, 1985.

KARTHA, K.K. Meristem culture and germplasm preservation. In: KHARTHA, K.K. **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Roton: CRS Press. 1985, p.115-134.

LEITE, E.J. **Introdução e conservação de germoplasma de mamona no Brasil, no período 1999 a 2001**. <<http://www.giacometti.org.br/html/artigo>> Acesso em 15 setembro 2004.

LEONHARDT, K.W.; STANWOOD, P.C.; TANIGUCHI, K.T. **Genetic conservation of palm germplasm in liquid nitrogen with emphasis on seed moisture content as a function of survival**. Honolulu: University of Hawaii at Manoa, College of Tropical Agriculture and Human Resources, Cooperative Extension Service, 1984. p.44-67.

MAZZANI, B. Euforbiáceas oleaginosas Taitago. In: MAZZANI, B. **Cultivo y mejoramiento de plantas oleaginosas**. Caracas, Venezuela: Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, 1983. p.227-360.

MOSHKIN, V.A. **Castor**. New Delhi: Oxonian Press, 1986. 315p.

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

NÓBREGA, M.B. de M.; ANDRADE, F.P.; SANTOS, J.W.; LEITE, E.J. Germoplasma. In: AZEVEDO, D.M.P. e LIMA, E.F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001, 350p.

RAJA, K.; PALANISAMY, V.; SELVARAJU, P. Desiccation and cryopreservation of recalcitrant arecanut (*Areca catechu* L.) embryos. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v.133, p.16-18, 2003.

RIBEIRO, C.S.N.; CASTRO, J.P.; FURTADO, C.M.; RIBEIRO, I.L.A.C.; SANTOS, T.S.; CARVALHO, J.M.F.C. Renegeração do banco ativo de germoplasma de mamona (*Ricinus communis* L.) através do cultivo *in vitro*. In: EMBRAPA-CNPA. I

**Congresso Brasileiro de Mamona.** Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 2004. CD-ROM.

ROCHA, S.R.; OLIVEIRA, K.C.; COSTA, M.N.; CUNHA, A.O.; CARVALHO, J.M.F.C.; SANTOS, J.W. Métodos de regeneração *in vitro* da mamoneira a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista Brasileira de Oleagionosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.7, n.1, p.653-658, 2003.

SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry, 32. Cryopreservation of plant germplasm I.** Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1995, p.53-69.

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

SANTOS, I.R.I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biociência e Desenvolvimento.** Brasília: KL3, v.4 ,n.20, p.60-65, 2001.

SANTOS, I.R.I.; SALOMÃO, A.N.; MUNDIM, R.C.; RIBEIRO, F.N.S. **Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de café (*Coffea arabica* L.).** Brasília, DF. Embrapa, 4p., 2002. (Comunicado Técnico, 69).

STANWOOD, P.C.; BASS, L.N. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.9, p. 423-437, 1981.

STANWOOD, P.C. Cryopreservation of seed germplasm – a preliminary guide to the practical preservation of seed germplasm in liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>, -196°C). In: IBPGR. **Report of the Second Meeting.** Advisory Committee on Seed Storage, p. 8-27, 1984.

STANWOOD, P.C. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: KHARTA, K. K. **Plant Cryopreservation.** CRC Press, p. 199-225, 1985.

STREET, H.E.; OPIK, H. Germinação. In: STREET, H.E.; OPIK, H. **Fisiologia das angiospermas: crescimento e desenvolvimento.** São Paulo: Polígono, 1974. p.7-34.

STREET, H.F.; OPIK, H. Germinação. In: MOSHKIN, V.A. (Ed.). **Castor.** New Delhi: Almerind, 1986. p.34-35.

STUSHNOFF, C.; SEUFFERHELD, M. Cryopreservation of Apple (*Malus* species) Genetic Resources. In.: BAJAJ, Y.P.S. ed, **Biotechnology in Agriculture and**



**Forestry**, vol. 32, Cryopreservation of Plant Germplasm I. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p.87-101, 1995.

VERTUCCI, C.W. Effects of cooling rate on seeds exposed to liquid nitrogen temperatures. **Plant Physiology**, Bethesda, v.90, p.1478-1485, 1989.

VIEIRA, M.L.C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Brasília: KL3. v.3, n.14, p.18-20, 2000.

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.

## APÊNDICE

**Apêndice 1A.** Análise de variância da regeneração, número e comprimento de brotos emitidos por explantes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), submetidos ao processo da vitrificação.

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Regeneração (%)	Número de brotos	Comprimento de brotos (cm)
Explante (E)	1	6258,01**	0,0348 *	3,1375**
Dimetilsulfóxido (D)	3	38946,03**	5,9549**	3,6213**
Sacarose (S)	3	49,15 <sup>ns</sup>	0,0033 <sup>ns</sup>	0,0045 <sup>ns</sup>
E x D	3	967,38**	1,0469**	0,3503**
<b>D/ E1</b>				
	(3)			
Efeito linear	1	50000,00**	4,1519**	7,0448**
Efeito quadrático	1	4556,25**	0,7591**	0,9120**
Desvio da regressão	1	945,32**	0,0009 <sup>ns</sup>	0,0048 <sup>ns</sup>
<b>D/ E2</b>				
	(3)			
Efeito linear	1	63703,83**	15,2775**	3,7758**
Efeito quadrático	1	244,14**	0,4489**	0,0564 <sup>ns</sup>
Desvio da regressão	1	290,70**	0,3672**	0,1209**
E x S	3	17,38 <sup>ns</sup>	0,0043 <sup>ns</sup>	0,0022 <sup>ns</sup>
D x S	9	10,26 <sup>ns</sup>	0,0046 <sup>ns</sup>	0,0036 <sup>ns</sup>
E x D x S	9	10,79 <sup>ns</sup>	0,0041 <sup>ns</sup>	0,0062**
<b>E1</b>				
S	-	54,52 <sup>ns</sup>	0,0008 <sup>ns</sup>	7,0448 <sup>ns</sup>
S <sup>2</sup>	-	35,71 <sup>ns</sup>	0,0009 <sup>ns</sup>	0,9120 *
D	-	50000,00**	4,1519**	0,0003**
D <sup>2</sup>	-	4556,23**	0,7591**	0,0121**
SD	-	8,83 <sup>ns</sup>	0,0003 <sup>ns</sup>	0,0034 <sup>ns</sup>
<b>E2</b>				
S	-	68,15 <sup>ns</sup>	0,0007 <sup>ns</sup>	3,7758 <sup>ns</sup>
S <sup>2</sup>	-	0,59 <sup>ns</sup>	0,1250 <sup>ns</sup>	0,0564 <sup>ns</sup>
D	-	63703,83**	15,2775**	0,0052**
D <sup>2</sup>	-	244,14**	0,1189**	0,0013**
SD	-	3,25 <sup>ns</sup>	0,0005 <sup>ns</sup>	0,0035 <sup>ns</sup>
Resíduo	96	25,84635	0,008749	0,002369
Total	127			
CV (%)		7,74	11,91	7,67

\*\* Significativo a 1% de probabilidade

\* Significativo a 5% de probabilidade

<sup>ns</sup> Não significativo

**Apêndice 1B.** Análise de variância da regeneração, número e comprimento de brotos emitidos por explantes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), submetidos ao processo de encapsulamento-dessecação.

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Regeneração (%)	Número de brotos	Comprimento de broto (cm)
Explante (E)	1	41006,25**	3,8025**	5,5460**
Pré-cultivo (P)	1	756,25**	0,0625 *	0,0855 <sup>ns</sup>
Dessecação (D)	3	8789,58**	0,7783**	1,0635**
E x P	1	156,25 <sup>ns</sup>	0,0099 <sup>ns</sup>	0,0576 <sup>ns</sup>
E x D	3	656,25**	0,0975**	0,0192 <sup>ns</sup>
P x D	3	172,92 <sup>ns</sup>	0,0242 <sup>ns</sup>	0,0913 *
E x P x D	3	139,58 <sup>ns</sup>	0,0117 <sup>ns</sup>	0,0611 <sup>ns</sup>
D/ P1 E1	(3)			
Efeito linear	1	4500,00**	0,2880**	0,1739**
Efeito quadrático	1	400,00 *	0,0899**	0,0564 <sup>ns</sup>
Desvio da regressão	1	0,312E-10 <sup>ns</sup>	0,0020 <sup>ns</sup>	0,0357 <sup>ns</sup>
D/ P1 E2	(3)			
Efeito linear	1	5445,00**	0,5445**	0,7547**
Efeito quadrático	1	25,00 <sup>ns</sup>	0,0250 <sup>ns</sup>	0,0351 <sup>ns</sup>
Desvio da regressão	1	4,99 <sup>ns</sup>	0,0005 <sup>ns</sup>	0,0059 <sup>ns</sup>
D/ P2 C1	(3)			
Efeito linear	1	7220,00**	0,6125**	1,2954**
Efeito quadrático	1	899,99**	0,1225**	0,0025 <sup>ns</sup>
Desvio da regressão	1	180,00 <sup>ns</sup>	0,0125 <sup>ns</sup>	0,0432 <sup>ns</sup>
D/ P2 C2	(3)			
Efeito linear	1	9680,00**	0,9680**	1,2450**
Efeito quadrático	1	899,99**	0,0900**	0,0002 <sup>ns</sup>
Desvio da regressão	1	19,99 <sup>ns</sup>	0,0020 <sup>ns</sup>	0,0572 <sup>ns</sup>
E(encap) x E1	1	1445,00**	0,2000**	0,1051 *
E(encap) x E2	1	1445,00**	2,5920**	0,0162 <sup>ns</sup>
E(encap) x E1(pré+encap)	1	1445,00**	0,2000**	3,6722**
E(encap) x E2(pré+encap)	1	245,00 <sup>ns</sup>	0,0080 <sup>ns</sup>	0,1232 *
E(encap) x E1(encap)	1	1445,00**	0,2000**	3,1760**
E(encap) x E2(encap)	1	5,00 <sup>ns</sup>	0,0320 <sup>ns</sup>	0,0101 <sup>ns</sup>
Resíduo	66	74,24266	0,010606	0,024387
Total	127			
CV (%)		13,69	15,73	22,79

\*\* Significativo a 1% de probabilidade

\* Significativo a 5% de probabilidade

<sup>ns</sup> Não significativo

**Apêndice 1C.** Resumo da análise de variância da regeneração, comprimento de plântula e número de raízes emitidas por eixos embrionários de duas cultivares de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), submetidos a dessecação e ao armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C).

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Quadrados Médios		
		Regeneração (%)	Comprimento de Plântula (cm) <sup>1</sup>	Número de Raízes Emitidas
Cultivar (C)	1	1444,531**	9,4053**	3879,374**
Dessecação (D)	3	29557,030**	13,5607**	3586,057**
Armazenamento (A)	3	9165,364**	6,1467**	2058,613**
C x D	3	440,365 *	0,8764 <sup>ns</sup>	363,104**
<b>D/C1</b>				
D/C1	(3)			
Efeito linear	1	35701,250**		2737,919**
Efeito quadrático	1	15006,250**		51,984**
Desvio da regressão	1	404,999 *		30,604 *
<b>D/C2</b>				
D/C2	(3)			
Efeito linear	1	33415,320**		7273,297**
Efeito quadrático	1	5439,063**		1272,973**
Desvio da regressão	1	25,312 <sup>ns</sup>		516,612**
C x A	3	119,531 <sup>ns</sup>	1,5356**	166,114**
<b>A/C1</b>				
A/C1	(3)			
Efeito linear	1		0,5493 <sup>ns</sup>	827,019**
Efeito quadrático	1		0,6493 <sup>ns</sup>	453,263**
Desvio da regressão	1		1,1726 <sup>ns</sup>	507,993**
<b>A/C2</b>				
A/C2	(3)			
Efeito linear	1		2,3217 *	1163,084**
Efeito quadrático	1		1,2105 <sup>ns</sup>	1076,678**
Desvio da regressão	1		6,3016**	2646,155**
D x A	9	3418,142**	4,1988**	445,322**
C x D x A	9	170,920 *	0,5467 <sup>ns</sup>	27,547**
<b>C1</b>				
A	-	5672,796**	0,5493**	827,019**
A <sup>2</sup>	-	3393,439**	0,6493**	453,277**
D	-	35701,260**	15,0033**	2737,916**
D <sup>2</sup>	-	15006,310**	2,2586**	51,984**
AD	-	3617,789**	3,3318**	279,944**
<b>C2</b>				
A	-	61,05,720**	5,5017 <sup>ns</sup>	1163,084**
A <sup>2</sup>	-	1002,779**	3,0551 <sup>ns</sup>	1076,704**
D	-	33415,310**	20,3381**	7237,396**
D <sup>2</sup>	-	5439,074**	1,9102 *	1272,974**
AD	-	4725,918**	7,9889**	389,429**
Resíduo	96	75,26041	0,375586	7,333927
Total	127			
CV (%)		12,66	23,95	12,81

\*\* Significativo a 1% de probabilidade

\* Significativo a 5% de probabilidade

<sup>ns</sup> Não significativo

<sup>1</sup> Dados transformados em  $\sqrt{X+1}$

**Apêndice 1D.** Análise de variância da regeneração, comprimento de plântula e número de raízes emitidas por eixos embrionários de duas cultivares de mamoneira (*Ricinus communis* L.), após criopreservação em nitrogênio líquido (-196°C), durante cinco dias.

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Regeneração (%)	Comprimento de Plântula <sup>1</sup> (cm)	Número de Raízes Emitidas
Cultivar (C)	1	153,125 *	0,9451 *	5,375**
Embebição (E)	1	6612,500**	0,0271 <sup>ns</sup>	66,370**
Dessecação (D)	3	15293,750**	2,2211**	67,596**
Armazenamento (A)	1	14450,000**	0,3367 <sup>ns</sup>	39,194**
C x E	1	78,125 <sup>ns</sup>	1,1626 *	2,145 <sup>ns</sup>
C x D	3	138,542**	0,2811 <sup>ns</sup>	2,564**
C x A	1	153,125 *	0,4272 <sup>ns</sup>	8,216**
E x D	3	1664,583**	1,3176**	29,055**
E x A	1	7200,000**	1,2499 *	141,899**
D x A	3	6006,250**	2,0274**	45,187**
C x E x D	3	101,042**	0,1401 <sup>ns</sup>	3,950**
C x E x A	1	378,125**	0,4924 <sup>ns</sup>	11,502**
C x D x A	3	138,542**	0,1236 <sup>ns</sup>	6,234**
E x D x A	3	1560,417**	1,4476**	21,652**
C x E x D x A	3	84,375 *	0,1547 <sup>ns</sup>	4,585**
Resíduo	96	22,39583	0,228952	0,624106
Total	127			
CV (%)		5,37	21,07	10,58

\*\* Significativo a 1% de probabilidade

\* Significativo a 5% de probabilidade

<sup>ns</sup> Não significativo

<sup>1</sup> Dados transformados em  $\sqrt{X+1}$

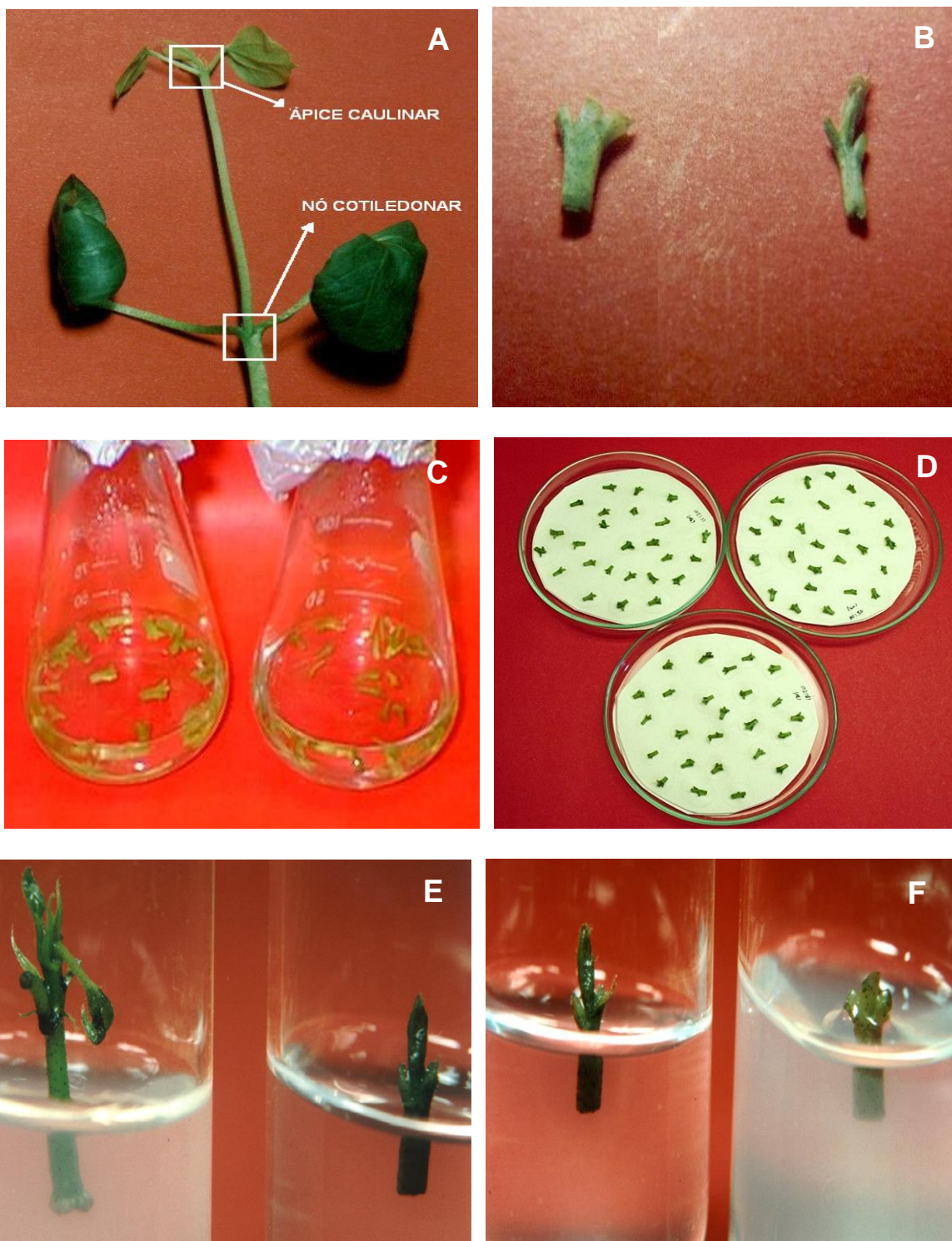
**Apêndice 1E.** Análise de variância da regeneração, comprimento de plântula e número de raízes emitidas por eixos embrionários de duas cultivares de mamoneira (*Ricinus communis* L.), submetidos a dessecação e armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C).

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Regeneração (%)	Comprimento de Plântula (cm)	Número de Raízes Emitidas
Cultivar (C)	1	50,00 <sup>ns</sup>	11,1628**	14,7832**
Dessecação (D)	3	29718,75**	107,8039**	328,4520**
Armazenamento (A)	3	12656,25**	22,0364**	96,4869**
C x D	3	131,25 *	1,6780**	31,0859**
C x A	3	314,58**	0,6301 *	9,1926**
D x A	9	3706,94**	12,2466**	31,4823**
C x D x A	9	145,83**	0,4075 <sup>ns</sup>	6,1342**
<b>C1</b>				
A	-	7162,96**	7,8482**	97,1723**
A <sup>2</sup>	-	2132,81**	3,1740**	6,5934**
D	-	41861,26**	167,6205**	599,2388**
D <sup>2</sup>	-	4225,04**	0,4900**	14,3447**
AD	-	4868,13**	14,9908**	34,5141**
<b>C2</b>				
A	-	11212,96**	15,4987**	51,0844**
A <sup>2</sup>	-	1945,90**	6,0128**	19,5997**
D	-	36551,25**	153,4580**	391,6125**
D <sup>2</sup>	-	6006,25**	1,5625**	27,0398**
AD	-	5493,01**	18,6431**	23,5624**
Resíduo	96	37,500	0,2136	0,7133074
Total	127			
CV (%)		8,79	12,98	14,51

\*\* Significativo a 1% de probabilidade

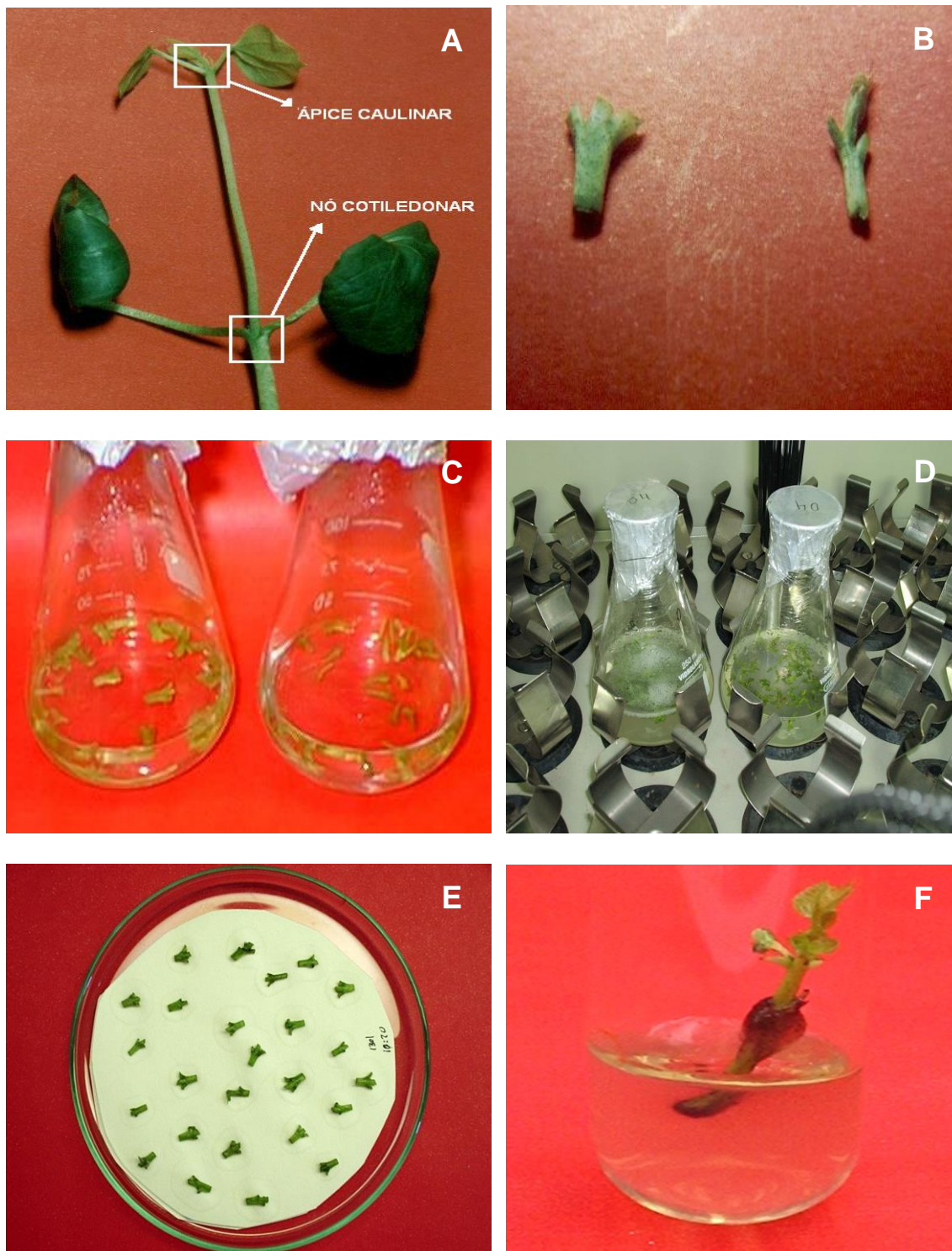
\* Significativo a 5% de probabilidade

<sup>ns</sup> Não significativo

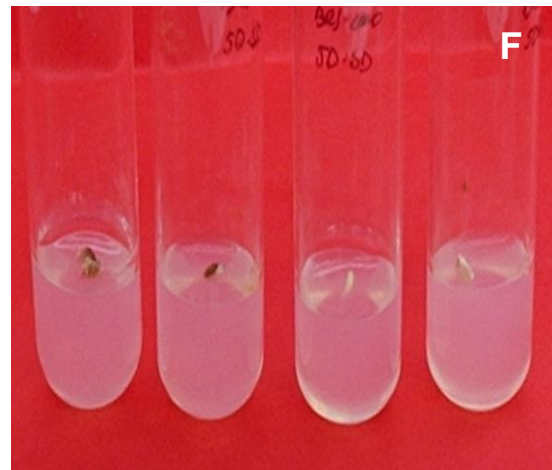
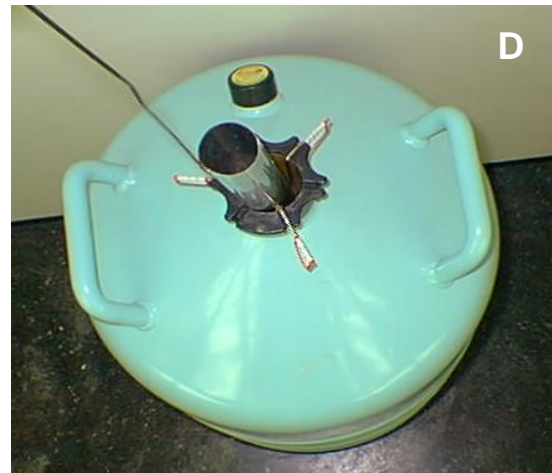
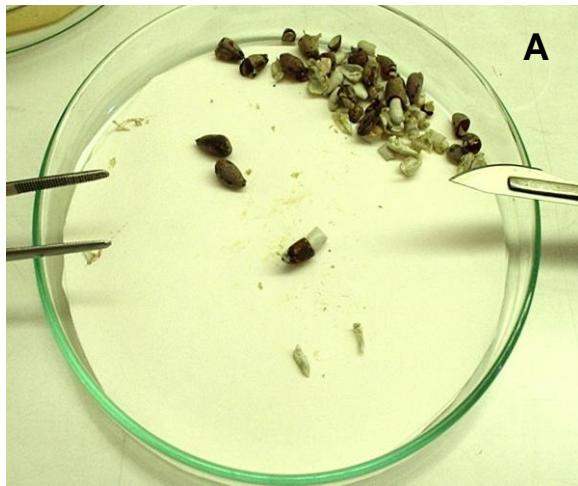


**Apêndice 1F.** Etapas do processo de vitrificação. A) planta matriz; B) explantes; C) Pré-cultivo com crioprotetores; D) eliminação do excesso do crioprotetor; E) regeneração antes e após criopreservação e F) Explantes com sinais de danos do congelamento (escurecidos).



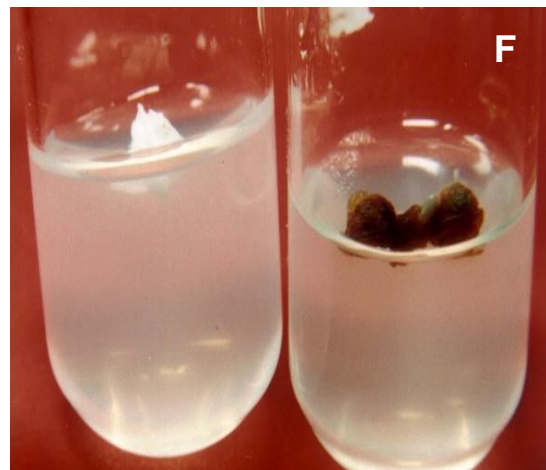
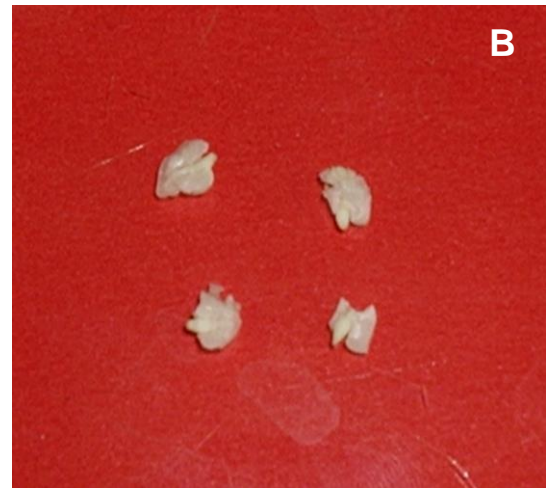


**Apêndice 1G.** Etapas do processo do encapsulamento-dessecação. A) planta matriz; B) explantes; C) meio de encapsulamento; D) explante encapsulado sob agitação; E) dessecação em câmara de fluxo laminar e F) Explantes encapsulado regenerado.



**Apêndice 1H.** Criopreservação de eixos embrionários de algodoeiro. A) extração; B) dessecação; C) criotubos; D) imersão em nitrogênio líquido; E) regeneração após criopreservação e F) eixos não regenerados após criopreservação.





**Apêndice 11.** Criopreservação de eixos embrionários da mamoneira. A) sementes; B) dessecação; C) criotubos; D) imersão em nitrogênio líquido; E) regeneração após criopreservação e F) eixos não regenerados após criopreservação.