

CRISTIANE GAMARANO DE MELO

**CRIOPRESERVAÇÃO DE GERMOPLASMA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA**  
**MINAS GERAIS – BRASIL**  
**2008**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M528c  
2008

Melo, Cristiane Gamarano, 1979-

Criopreservação de germoplasma de cana-de-açúcar /  
Cristiane Gamarano Melo. – Viçosa, MG, 2008.  
xi, 56f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Márcio Henrique Pereira Barbosa.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Cana-de-açúcar. 2. Cultura de tecidos (Anatomia e  
fisiologia) - Cultura e meios de cultura. 3. Sacarose -  
Secagem. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 633.61

CRISTIANE GAMARANO DE MELO

**CRIOPRESERVAÇÃO DE GERMOPLASMA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 03 de outubro de 2008

---

Prof<sup>ª</sup>. Marília Contin Ventrella  
(Co-Orientadora)

---

Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike  
(Co-Orientador)

---

Prof. Luiz Alexandre Peternelli

---

Prof. Wagner Campos Otoni

---

Prof. Márcio Henrique Pereira Barbosa  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre iluminou meu caminho e colocou todos nos momentos certos, para que eu jamais desistisse.

A meus pais Paulo e Nívia, por estarem sempre ao meu lado, pelos ensinamentos, dedicação, esforço e empenho para que eu pudesse estudar, fazendo dos meus sonhos os seus.

Às minhas irmãs Paula, Eliane e Rejane, por estarem sempre ao meu lado, pelo constante apoio e por sempre acreditarem em mim.

À Universidade Federal de Viçosa e ao programa Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realização do curso.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Márcio Henrique Pereira Barbosa, pela orientação, ensinamentos, paciência e confiança depositada durante a realização dos trabalhos.

Ao professor Sérgio Yoshimitsu Motoike, pelo aconselhamento, disponibilidade e auxílio na execução do projeto.

À professora Marília Contin Ventrella, pelo apoio e sugestões para o polimento do trabalho.

Ao professor Luiz Alexandre Peternelli, pela disponibilidade, pelo auxílio nas análises estatísticas que foram fundamentais no desenvolvimento do projeto, e pelas sugestões.

Ao professor Wagner Campos Otoni, pelas valiosas sugestões.

Ao bolsista de iniciação científica Marcone, pela ajuda e dedicação na execução dos experimentos.

Aos funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos e Células Vegetais do Departamento de Fitotecnia da UFV, Márcio e Cenira, pela ajuda sempre que precisei. Em especial ao Márcio, pela suas valiosas sugestões e contribuições na realização deste trabalho.

Às amigas do Laboratório de Cultura de Tecidos e Células Vegetais, Mychelle, Cândida, Patrícia, Elisa e Ana Paula pela ajuda, força e conselhos na realização dos experimentos.

Às inesquecíveis amigas do 623 Scheyna, Clésia, Diana e Kênia, pela amizade, incentivo, companheirismo, força, por estarem sempre presentes quando eu mais precisei.

Às amigas Elenise e Cyntia, pelo companheirismo, ajuda e incentivo.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigado!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRAT</b> .....	xi
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	4
1 – Criopreservação.....	4
2 – Etapas da Criopreservação.....	5
2.1 – Encapsulamento.....	5
2.2 – Pré-cultivo.....	5
2.3 – Secagem.....	7
2.4 – Congelamento.....	8
2.5 – Descongelamento.....	9
2.6 – Regeneração.....	10
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	10

### Capítulo 1

#### **ESTUDO DO PRÉ-CULTIVO EM MEIO ENRIQUECIDO COM SACAROSE NA AQUISIÇÃO DE TOLERÂNCIA DOS TECIDOS DA VARIEDADE DE CANA-DE-AÇÚCAR RB72454 À SECAGEM**

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 – MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	16
2.1 – Estabelecimento <i>in vitro</i> .....	17
2.2 – Encapsulamento.....	18
2.3 – Determinação do teor de umidade das cápsulas e validação.....	18
2.4 – Determinação do teor de umidade das cápsulas quando pré-cultivadas em diferentes concentrações de sacarose.....	19
2.5 – Pré-cultivo, secagem e teste de viabilidade.....	20
2.6 – Análise histológica.....	21
<b>3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	23
3.1 – Determinação dos teores de umidade após a exposição dos ápices caulinares encapsulados à secagem.....	23
3.2 – Efeito da concentração de sacarose na perda de umidade dos ápices caulinares encapsulados.....	26
3.3 – Efeito das diferentes concentrações de sacarose na aquisição de tolerância à secagem.....	28
3.4 – Influência das diferentes concentrações de sacarose no índice de sobrevivência dos explantes expostos à secagem durante 10,1 horas.....	32
3.5 – Efeito do tempo de pré-cultivo no índice de sobrevivência dos explantes.....	34
<b>4 – CONCLUSÕES</b> .....	37
<b>5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	37

**Capítulo 2**  
**EFEITO DE TRÊS MÉTODOS DE DESCONGELAMENTO EM ÁPICES**  
**CAULINARES ENCAPSULADOS CRIOPRESERVADOS DA VARIEDADE DE**  
**CANA-DE-AÇÚCAR RB72454**

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	42
<b>2 – MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	43
2.1 – Estabelecimento <i>in vitro</i> .....	43
2.2 – Criopreservação.....	44
2.2.1 – Encapsulamento.....	44
2.2.2 – Pré-cultivo e secagem.....	45
2.2.3 – Congelamento e descongelamento.....	45
2.3 – Análise histológica.....	46
<b>3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	48
<b>4 – CONCLUSÃO</b> .....	53
<b>5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	53
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	56

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

#### ESTUDO DO PRÉ-CULTIVO EM MEIO ENRIQUECIDO COM SACAROSE NA AQUISIÇÃO DE TOLERÂNCIA DOS TECIDOS DA VARIEDADE DE CANA-DE-AÇÚCAR RB72454 À SECAGEM

- Figura 1.** Curva representativa da variação no teor de umidade das cápsulas em função do tempo de secagem, destacando o tempo de exposição ao ar em câmara de fluxo laminar para obtenção dos teores de umidade de 30, 20 e 10%..... 24
- Figura 2.** Ápices caulinares de cana-de-açúcar encapsulados expostos à secagem. A: aspecto das cápsulas e dos explantes antes da exposição à secagem, umidade inicial. B: cápsulas após 10 horas de secagem. C: cápsulas e ápices caulinares após 21 horas de secagem. Observar a cor mais escura (amarelada) adquirida pelas cápsulas e pontos necrosados nos ápices caulinares em C..... 25
- Figura 3.** Efeito dos vários tempos de secagem (0; 5,7; 7,45 e 10,1 horas) em câmara de fluxo laminar no teor de umidade dos ápices caulinares encapsulados, pré-cultivados ou não em meio de cultura enriquecido com 0,3; 0,5 e 0,75 M de sacarose..... 26
- Figura 4.** Seções longitudinais de ápices caulinares de cana-de-açúcar. A-B: controle, imediatamente após a extração. C-D: após 12 horas em MB. Nota-se a presença de grãos de amido, corados de negro, em D. Barra = 200  $\mu\text{m}$  (A), 25  $\mu\text{m}$  (B-D)..... 28
- Figura 5.** Efeito das diferentes concentrações de sacarose (0; 0,3; 0,5 e 0,75M) na aquisição de tolerância dos tecidos à secagem durante 0; 5,7; 7,45 e 10,1 horas, em função do índice médio de sobrevivência dos explantes. Para cada concentração de sacarose, as barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey..... 30
- Figura 6.** Efeito da concentração de sacarose na aquisição de tolerância à secagem durante 10,1 horas em câmara de fluxo laminar. Os resultados foram analisados pela média do índice de sobrevivência. As barras com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 33
- Figura 7.** Seções longitudinais de ápices caulinares de cana-de-açúcar. A: pré-cultivo em solução 0,3 M durante um dia e secagem durante 10,1 horas. B: pré-cultivo durante um dia em solução 0,3 M de sacarose, e secagem durante 10,1 horas após três dias em MB. Notar o citoplasma retraído em A. Barra = 25  $\mu\text{m}$  (A), 50  $\mu\text{m}$  (B)..... 34
- Figura 8.** Efeito das concentrações de sacarose (0,3; 0,5 e 0,75M), combinadas com o tempo de pré-cultivo (1 e 2 dias), no índice médio de sobrevivência dos explantes. Para cada concentração de sacarose, as barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey..... 35

**Figura 9.** Efeito do tempo de pré-cultivo em solução de sacarose (0,3; 0,5 e 0,75M) no índice de sobrevivência médio dos explantes. Para o mesmo tempo de pré-cultivo, as barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey..... 35

## **Capítulo 2**

### **EFEITO DE TRÊS MÉTODOS DE DESCONGELAMENTO EM ÁPICES CAULINARES ENCAPSULADOS CRIOPRESERVADOS DA VARIEDADE DE CANA-DE-AÇÚCAR RB72454**

**Figura 1.** Seções longitudinal e transversal de ápices caulinares de cana-de-açúcar. A: ápice pré-cultivado durante um dia em MB enriquecido com 0,5 M de sacarose, não exposto a secagem, congelado, descongelado em solução de sacarose 0,75 M, após 7 dias em MB. B: ápice pré-cultivado durante um dia em MB enriquecido com 0,3 M de sacarose, não exposto à secagem, após 3 dias em MB. C-D: ápice pré-cultivado durante um dia em MB enriquecido com 0,5 M de sacarose, exposta à secagem durante 7,45 horas, congelado, descongelado a temperatura ambiente durante 20 minutos, após 7 dias em MB. Notar a retração do citoplasma em A e o aspecto desidratado das células em C e D. Barra = 50  $\mu\text{m}$  (A, D), 100  $\mu\text{m}$  (B), 200  $\mu\text{m}$  (C)..... 49

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

#### ESTUDO DO PRÉ-CULTIVO EM MEIO ENRIQUECIDO COM SACAROSE NA AQUISIÇÃO DE TOLERÂNCIA DOS TECIDOS DA VARIEDADE DE CANA-DE-AÇÚCAR RB72454 À SECAGEM

**Tabela 1.** Combinação da concentração de sacarose X tempo de pré-cultivo X tempo de secagem utilizada na indução de tolerância à secagem e ao congelamento, em ápices caulinares de cana-de-açúcar encapsulados..... 22

**Tabela 2.** Resumo da análise de variância do índice de sobrevivência dos explantes.. 29

### Capítulo 2

#### EFEITO DE TRÊS MÉTODOS DE DESCONGELAMENTO EM ÁPICES CAULINARES ENCAPSULADOS CRIOPRESERVADOS DA VARIEDADE DE CANA-DE-AÇÚCAR RB72454

**Tabela1.** Combinação da concentração de sacarose X tempo de pré-cultivo X tempo de secagem X método de descongelamento, utilizada na criopreservação de ápices caulinares de cana-de-açúcar encapsulados..... 47

## RESUMO

MELO, Cristiane Gamarano, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2008. **Criopreservação de germoplasma de cana-de-açúcar**. Orientador: Márcio Henrique Pereira Barbosa. Co-orientadores: Marília Contin Ventrella e Sérgio Yoshimitsu Motoike.

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de protocolos para criopreservação, em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , de germoplasma de cana-de-açúcar. O tempo de exposição dos ápices caulinares encapsulados a câmara de fluxo laminar para a obtenção dos teores de umidade de 30, 20 e 10% foi determinado através de um ensaio e os resultados obtidos foram analisados e interpretados utilizando o software livre R. Os pontos médios de cada tempo avaliado foram unidos por segmentos de reta traçando uma linha de tendência de perda de umidade. Posteriormente, com o auxílio de linhas horizontais referentes aos teores de umidade de 30, 20 e 10%, os tempos de secagem foram identificados diretamente no gráfico em 5,7; 7,45 e 10,1 horas, respectivamente. Para induzir a tolerância dos ápices caulinares à secagem foi realizado o pré-cultivo em meio de cultura líquido enriquecido com 0,3; 0,5 e 0,75 M de sacarose por um e dois dias. O experimento foi organizado em um esquema fatorial  $3 \times 2 \times 4$  (concentrações de sacarose, tempo de pré-cultivo e tempo de secagem) segundo o delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Os dados do índice de sobrevivência obtidos foram analisados e interpretados utilizando o software livre R. Foi realizada a análise de variância e quando necessário as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Os resultados indicaram que o pré-cultivo em meio de cultura enriquecido com 0,3 M de sacarose, independentemente se por um ou dois dias, foi ideal para induzir a tolerância dos tecidos à secagem. Os ápices caulinares foram sensíveis à concentração de 0,75 M de sacarose na solução de pré-cultivo. O cultivo por 12 horas dos ápices caulinares em meio básico de cultura resultou além da recuperação do estresse gerado pela sua extração, a reativação do seu metabolismo através do acúmulo de grão de amido. A síntese de amido aumentou em intensidade quando os ápices foram pré-cultivados em meio de cultura líquido contendo sacarose nas concentrações de 0,30; 0,50 e 0,75 M. Na criopreservação dos ápices caulinares encapsulados, estudou-se o efeito de três fatores, concentração de sacarose, tempo de secagem e o método de descongelamento, em um fatorial  $3 \times 4 \times 3$ . Independentemente da combinação adotada quando os ápices caulinares foram criopreservados o índice de

sobrevivência obtido foi nulo. As análises histológicas revelaram que as células e a parede celular dos explantes criopreservados foram severamente danificadas.

## ABSTRACT

MELO, Cristiane Gamarano, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October 2008.  
**Cryopreservation of the sugarcane germplasm.** Adviser: Márcio Henrique Pereira Barbosa. Co-advisers: Marília Contin Ventrella and Sérgio Yoshimitsu Motoike.

This study was carried out to develop some protocols for cryopreservation of sugarcane germplasm in liquid nitrogen at  $-196^{\circ}\text{C}$ . The exposure time of the shoot tips encapsulated in the laminar flow chamber for obtaining the moisture contents of 30, 20 and 10% was determined in an assay. The results were analyzed and interpreted, by using the free R software. The medium points of each time under evaluation were united by straight line segments, as drawing a tendency line for the moisture loss. Then, with the aid of horizontal lines referring to moisture contents of 30, 20 and 10%, the drying times were directly identified in the graph at 5.7; 7.45 and 10.1 hours, respectively. To induce the tolerance of the shoot tips to drying process, the preculture was accomplished in liquid culture medium enriched with 0.3; 0.5 and 0.75M sucrose for one and two days. The entirely randomized experimental design was used under a factorial scheme  $3 \times 2 \times 4$  (sucrose concentrations, preculture time and drying time) with three replicates. The survival index data were analyzed and interpreted, by using the free R software. The variance analysis was performed and the averages were compared by the Tukey test at 5% significance, when necessary. According to the results, the following conclusions were drawn: independently of the preculture time to be one or two days, the preculture in the culture medium enriched with 0.3M sucrose was ideal to induce the tolerance of the tissues to drying; the shoot tips were sensitive to the concentration of 0.75M sucrose in the preculture solution. The 12h culture of the shoot tips in the basic culture medium resulted into reactivation of their metabolism through accumulation of the starch grain, besides the recovery of the stress generated by its extraction. The intensity of the starch synthesis was increased, when the shoot tips were precultured in the liquid culture medium containing sucrose at concentrations 0.30; 0.50 and 0.75M. In the cryopreservation of the encapsulated shoot tips, the effect of the sucrose concentration, drying time and defrosting method were studied under a factorial  $3 \times 4 \times 3$  (three sucrose concentrations, four drying times and three defrosting methods). Independently of the combination adopted when the shoot tips were cryopreserved, a null survival index was obtained. The histological analyses revealed that both cells and cellular walls of the cryopreserved explants were severely damaged.

## INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar foi caracterizada por Bacchi (1983) como pertencente ao gênero *Saccharum* L., da Divisão Embryophita siphonogama; Subdivisão Angiospermae; Classe Monocotyledoneae; Ordem Glumiflorae; Família Poaceae; Tribo Andropogonae; Subtribo Saccharae. A cana-de-açúcar é uma planta alógama (Walker, 1987) e, segundo Jeswiet (1925), o gênero *Saccharum* L. apresenta as seguintes espécies: *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinense* e *S. barberi*. No entanto, Artschwager e Brandes (1958) incluíram para o mesmo gênero mais duas espécies: *S. robustum* e *S. edule*. Dentre as espécies citadas, apenas *S. spontaneum* e *S. robustum*, são consideradas puras sendo as demais de origem híbrida (Stevenson, 1965).

A cana-de-açúcar é uma das mais importantes espécies cultivadas nos trópicos e subtropicais. No Brasil possui elevada importância econômica, social e ambiental (Lopes, 2007). O Brasil é o maior produtor mundial de açúcar e álcool de cana, apresentando os menores custos de produção, bem como o maior exportador destes produtos (SEAAAP, 2006). O prognóstico da produção de cana-de-açúcar para a safra de 2008/09 é de 607,8 a 631,5 milhões de toneladas, o que representa um aumento de 8,8% a 13,1%, comparativamente ao obtido na safra passada (CONAB, 2008). Este estimado aumento na produção se baseia tanto nas ótimas condições climáticas registradas nas regiões canavieiras quanto no aumento da área cultivada que, segundo o IBGE (2008), passou de 6,7 milhões de hectares em 2007 para 7,13 milhões de hectares em 2008. Os elevados investimentos do setor sucroalcooleiro no melhoramento tecnológico das unidades de processamento, bem como a introdução de novas variedades mais produtivas e a instalação de sistemas de irrigação também contribuíram para o aumento da produção (CONAB, 2008).

O melhoramento genético da cana-de-açúcar tem contribuído para o aumento na produção, através da obtenção de variedades de alto rendimento e de resistência a pragas e doenças. Entretanto, para se obter sucesso no programa de melhoramento, como a obtenção de novas variedades com alto rendimento e resistentes a pragas e doenças, é necessário que a variabilidade dos recursos genéticos desejáveis de determinada espécie esteja disponível para sua utilização. Com isso, as coleções de germoplasma passam a ter papel fundamental nos programas de melhoramento (Silva et al., 1997). Atualmente as variedades de cana-de-açúcar cultivadas são híbridas da sexta a décima geração, em cuja constituição genética predomina a constituição de

*Saccharum officinarum*, com menor participação de *Saccharum spontaneum*, *Saccharum barberi*, *Saccharum sinense* e, em alguns casos, *Saccharum robustum* (Matsuoka et al., 1999).

O germoplasma da cana-de-açúcar é conservado *in vivo*, em condições de campo, em decorrência de sua forma de propagação, que é vegetativa e não seminífera. Contudo, as coleções são grandes e acabam absorvendo recursos e ocupando grandes áreas. Outro problema refere-se à vulnerabilidade, pois, as plantas ficam expostas ao ataque de patógenos, intempéries climáticas e vandalismo, podendo até ocorrer perdas devido falhas na identificação (Withers e Engelmann, 1998). No caso específico da cana-de-açúcar, as coleções necessitam de renovação para a limpeza fitossanitária dos germoplasmas, para eliminação das principais bacterioses sistêmicas da cana-de-açúcar como escaldadura da folha e raquitismo da soqueira.

As duas maiores coleções mundiais de germoplasma de cana-de-açúcar são mantidas pela United States Department of Agriculture - USDA ([www.usda.gov](http://www.usda.gov)) em Miami, Flórida, Estados Unidos, bem como pelo Bangladesh Sugarcane Research Institute – BSRI ([www.bsri.gov.bd](http://www.bsri.gov.bd)) em Coimbatore, Índia. Este instituto é responsável pela maior coleção de germoplasma de cana-de-açúcar no mundo, a qual é continuamente usada para amplificação da base genética de futuras variedades de cana-de-açúcar e melhoria de produtividade (USDA, 2008).

No Brasil, há dois bancos de germoplasma, sendo um localizado na Estação de Floração e Cruzamento da Serra do Ouro, no município de Murici, Estado de Alagoas. Neste banco estão reunidos mais de 2000 genótipos, entre cultivares utilizados no país, clones, outras espécies relacionadas ao gênero *Saccharum* e cultivares importados das diferentes regiões canavieiras do mundo. Este banco é considerado um dos mais completos do mundo. O outro banco de germoplasma está localizado em Camamu, Estado da Bahia. No entanto, nenhuma destas coleções e, ou bancos é completa, além de não existirem instalações de armazenamento a longo prazo para garantir a preservação do germoplasma, que é mantido vegetativamente. Estas coleções e, ou bancos fornecem os genótipos, que serão utilizados nos cruzamentos para obtenção de sementes responsáveis pelo surgimento das novas variedades.

Grande parte dos germoplasmas mantidos nestas coleções e, ou bancos não é utilizada rotineiramente nos programas de cruzamentos, porém ocupa espaço e absorve recursos para sua manutenção. Os germoplasmas pouco utilizados nos programas de cruzamento poderiam ser conservados *in vitro*, através da técnica da cultura de tecidos.

A conservação *in vitro* permite aumentar o período entre os subcultivos, quando são realizadas mudanças no ambiente de cultivo para reduzir ou suprimir totalmente o crescimento das células e dos tecidos (Lemos et al., 2002). Dois procedimentos têm sido adotados: o crescimento lento e a criopreservação.

O crescimento lento baseia-se na redução do metabolismo da planta, aumentando ao máximo os intervalos entre os subcultivos ou estendendo-o indefinidamente, sem afetar a viabilidade das plântulas. Para reduzir o metabolismo das plantas, são realizadas modificações nas condições físicas (temperatura e luminosidade) ou químicas do meio de cultura (nutrientes orgânicos e inorgânicos, reguladores osmóticos ou inibidores de crescimento) (Lemos et al., 2002). Devido ao fato de se basear na redução do crescimento, este procedimento apresenta grande risco, pois, pode acarretar estresse nas plântulas, variação somaclonal (mutações que ocorrem espontaneamente em cultura de tecidos, com o aumento dos subcultivos) e também perda por contaminação e erro humano (Withers e Engelmann, 1998).

Outra técnica alternativa para a conservação de germoplasma é a criopreservação, que consiste como conservação de material biológico em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  ou em sua fase de vapor a  $-150^{\circ}\text{C}$  (Kantha, 1985). A esta temperatura ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), o metabolismo celular é eficientemente paralisado e o material pode ser conservado em estado de suspensão metabólica, em condições livres de riscos de contaminação por patógenos e, ou de variações genéticas, durante longo período. Popov et al. (2006) sugerem a criopreservação como método mais confiável para armazenamento, em longo prazo, dos recursos genéticos vegetais. As vantagens da criopreservação comparativamente a outros métodos convencionais de preservação de germoplasmas são: redução nos custos associados à manutenção de coleções vivas, redução no espaço de armazenamento do material, e minimização das variações somaclonais (Bajaj, 1995). O único custo da conservação do germoplasma criopreservado é limitado ao abastecimento regular e seguro de nitrogênio líquido (Reed et al., 2005).

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver protocolos para a criopreservação de germoplasma da cana-de-açúcar.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1 – Criopreservação

Criopreservação é definida como a conservação de material biológico em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , ou em sua fase de vapor a  $-150^{\circ}\text{C}$  (Kantha, 1985). A criopreservação é capaz de interromper todo o metabolismo celular, sendo considerada o método mais promissor de preservação a longo prazo para células, tecidos e órgãos vegetais. Esses explantes poderão ser regenerados em plantas em qualquer época, sem risco de variações genéticas (Carvalho e Vidal, 2003). Nos últimos vinte anos, foram publicados numerosos relatos de criopreservação de plantas de propagação vegetativa, cereais e gramíneas, plantas ornamentais, frutíferas tropicais e temperadas, leguminosas e oleaginosas, estimulantes, medicinais e aromáticas, entre outras (Santos, 2000).

Meristemas e ápices caulinares são mais apropriados para a criopreservação porque suas células são pequenas, contêm citoplasma denso com poucos vacúolos (pouca água), possuem tecidos organizados e têm menor chance de sofrerem variação somaclonal. Entretanto, outros tipos de explantes como raízes, células em cultura, protoplastos, pólen, anteras, embriões (somáticos, zigóticos ou nucelares) e sementes inteiras de várias espécies foram regenerados com sucesso, após o congelamento em nitrogênio líquido (Kantha, 1985; Withers, 1987). As estruturas de tamanho reduzido são mais indicadas para congelamento, uma vez que a desidratação e o congelamento ocorrem de forma mais rápida e uniforme em estruturas menores (Carvalho e Vidal, 2003).

O sucesso de um protocolo depende da tolerância e sensibilidade do germoplasma da planta aos estresses acumulados ao longo de cada processo do procedimento de criopreservação. Ao escolher o tratamento crioprotetor ou protocolo é importante levar em conta a origem e estado fisiológico do germoplasma a ser criopreservado (ex., se é temperado ou tropical, se é dormente ou ativo), a tolerância ao estresse abiótico (ex., ao frio e a seca) bem como aos fatores técnicos, operacionais e práticos. Ao implantar protocolos de criopreservação em larga escala, é necessário que o protocolo seja tecnicamente simples e que seja empregado para uma ampla base genética, assegurando, assim, que o armazenamento criogênico tenha custo, manuseio e tempo eficazes com resultados previsíveis e reproduzíveis (Reed et al., 2005).

## 2 – Etapas da criopreservação

A criopreservação compreende as seguintes etapas: encapsulamento, pré-cultivo, secagem ou desidratação, congelamento, descongelamento e regeneração.

### 2.1 – Encapsulamento

A técnica do encapsulamento-desidratação foi desenvolvida por Fabre e Dereuddre (1990). Este processo é denominado encapsulamento-desidratação e baseia-se na tecnologia desenvolvida para a produção de sementes artificiais. A técnica consiste no encapsulamento dos explantes em gel de alginato de sódio e vem sendo utilizada para conservação de uma diversidade de germoplasma de plantas temperadas e tropicais (Sakai, 2004), incluindo algumas que, previamente, mostraram-se intolerantes ao congelamento, como gemas apicais de pereira (Scottez et al., 1992), batata-inglesa (Fabre e Dereuddre, 1990), videira (Plessis et al., 1993), chicória (Vandenbussche et al., 1993) e embriões somáticos de cenoura (Dereuddre et al., 1991). Os explantes encapsulados são pré-cultivados em meio contendo altas concentrações de sacarose, desidratados pela exposição ao ar da capela de fluxo laminar ou com sílica gel, diretamente imersos em nitrogênio líquido e descongelados lentamente (Engelmann, 1998).

Em comparação com as outras técnicas de criopreservação, o encapsulamento-desidratação apresenta várias vantagens como a facilidade no manuseio dos explantes, a possibilidade de armazenar grande quantidade de tecidos delicados, e de utilizar crioprotetores não tóxicos (sacarose, glicerol), além de os explantes serem eficientemente protegidos durante a desidratação (Verleysen et al., 2005). Esta técnica permitiu o congelamento de ápices caulinares de pêra de até 5 mm de comprimento (Withers e Engelmann, 1998). O índice de sobrevivência é alto e a regeneração e crescimento das amostras criopreservadas é rápida e direta, não ocorrendo a formação de calo (Luan, 2001).

### 2.2 – Pré-cultivo

As técnicas de criopreservação mais adotadas baseiam-se na vitrificação ou formação do estado vítreo, em que a água sofre uma transição da fase líquida para um

estado sólido amorfo e meta-estável. O sólido formado é uma solução supersaturada e de alta viscosidade, embora não ocorra formação de uma estrutura cristalina, contém as propriedades mecânicas de um sólido, mas com a manutenção da desordem e das propriedades físicas de um líquido (Hoeksra et al., 2001a).

No estado vítreo, as taxas de difusão molecular e as reações químicas são bastante reduzidas (Hoekstra et al., 2001a). O estado vítreo tem efeitos benéficos na célula desidratada: limitação da perda de água, limitação da cristalização de sais e proteínas no citoplasma, proteção contra mudanças no pH à medida que a água é removida, bem como a prevenção de colapso celular durante intensa perda de água (Leopold, 1990; Koster, 1991). Devido à elevada viscosidade adquirida, todas as reações químicas que necessitam da difusão molecular da água são paralisadas, sendo que o material biológico nesta condição estável pode ser mantido durante longo período de tempo (Gonzalez-Arno et al., 2008).

A vitrificação do citoplasma é obtida através da desidratação dos tecidos para um teor de umidade em que não exista água livre para a formação dos cristais de gelo, quando o material é congelado em nitrogênio líquido (-196°C). A desidratação pode ser obtida por evaporação da água ou pelo tratamento com soluções concentradas de crioprotetores químicos (solução de vitrificação), tais como o dimetilsulfóxido (DMSO), etileno glicol, metanol, glicerol e propileno glicol, que são os crioprotetores comumente utilizados. Entretanto, estes crioprotetores podem ser tóxicos ou causar estresse osmótico, levando à morte das células ou modificando sua resposta morfogênética em cultura (Kantha, 1985; Sakai, 1995). Estes crioprotetores químicos estão sendo substituídos pelo pré-cultivo em meio enriquecido com açúcares (sacarose, trealose e glucose), que também são substâncias crioprotetoras.

O pré-cultivo precede a secagem e consiste em aplicar um tratamento no material a ser criopreservado, visando aumentar a resistência das células aos estresses resultantes da desidratação. Estes tratamentos são baseados em mecanismos fisiológicos de resistência, observados em organismos tolerantes. Tais mecanismos compreendem uma série de eventos coordenados durante a desidratação e que estão diretamente associados à prevenção dos danos oxidativos e na manutenção da estrutura natural de macromoléculas e membranas celulares nestes organismos (Hoekstra et al., 2001b).

No pré-cultivo, o material a ser criopreservado é usualmente colocado em um meio de cultura líquido enriquecido com sacarose, onde permanece durante um a dois dias. O alto nível de açúcar acumulado pelas células, durante o pré-cultivo, é muito

importante para melhorar a sobrevivência do material criopreservado. O acúmulo de açúcares pelas células aumenta a estabilidade da membrana, quando exposta à severa desidratação (Sakai, 1998). Os açúcares não apresentam citotoxicidade, mesmo quando acumulados em grande quantidade no citoplasma. Em comparação aos crioprotetores tradicionais, esses açúcares apresentam alta eficiência na estabilização das membranas celulares durante o congelamento. Seu efeito protetor está, supostamente, associado à vitrificação das membranas celulares no citoplasma (Hirsh, 1987; Leopold, 1990; Koster, 1991).

### 2.3 – Secagem

O principal obstáculo da criopreservação é a formação de cristais de gelo no interior das células, durante o congelamento. A formação desses cristais de gelo no meio intracelular causa ruptura no sistema de membranas celulares, o que resulta em perda da semipermeabilidade e da compartimentalização celular. Em consequência, as células entram em colapso e morrem (Panis e Lambardi, 2005). Esta injúria mecânica, sofrida pelas células criopreservadas, advém de dois fenômenos: do comportamento da água, que se expande ao congelar-se e da conformação dos cristais de gelo. Os explantes usados na criopreservação (calos, embriões zigóticos ou somáticos, gemas apicais e laterais, sementes e suspensões celulares) apresentam altos teores de água em suas células, o que favorece a formação desses cristais. Uma formação extensiva de cristais de gelo intracelular ocorrerá, se estes tecidos forem congelados no estado hidratado (Santos, 2001). Portanto, é necessário remover a água antes do congelamento, para evitar a injúria causada pelos cristais de gelo.

A secagem é a etapa da criopreservação que é indispensável ao sucesso da técnica. Esta etapa precede o congelamento e tem a função de retirar a água das células, para evitar a formação de cristais de gelo em seu interior. A secagem pode ser realizada através da exposição do explante ao ar da câmara de fluxo laminar ou em sílica gel (Engelmann, 2004). Maior índice de sobrevivência é obtido, quando as amostras são congeladas com um teor de umidade entre 10 e 20% (Engelmann, 2004).

A secagem é um obstáculo na criopreservação porque a água desempenha muitas funções biológicas fundamentais nas células de organismos vivos. A água é um importante solvente, meio de transporte, resfriador (através da evaporação), bem como um constituinte essencial e estabilizador da estrutura das macromoléculas e organelas,

cuja conformação funcional se mantém, principalmente, devido às interações hidrofílicas e hidrofóbicas entre elas (Kramer e Boyer, 1995; Vertucci e Farrant, 1995). Portanto, o sucesso de um protocolo de criopreservação depende da desidratação para um teor de umidade que seja baixo o suficiente para evitar a formação de gelo intracelular, mas não tão reduzido que cause injúria por desidratação (Santos, 2001).

## 2.4 – Congelamento

O congelamento das amostras após o processo da desidratação é geralmente realizado em nitrogênio líquido, a temperaturas em torno de  $-196^{\circ}\text{C}$ . Na criopreservação são utilizados dois tipos de congelamento: lento e rápido.

No congelamento lento, o gelo é formado fora da célula, evitando-se a cristalização de gelo no interior da célula. Como a água é retirada para o meio extracelular, a célula fica desidratada e esta desidratação reduz a quantidade de água disponível à formação prejudicial de cristais de gelo. Em seguida, o conteúdo de água se solidifica, ocorrendo normalmente a formação de cristais de gelo inofensivos à integridade da célula. Este processo envolve o congelamento lento até uma temperatura previamente definida (temperatura de pré-congelamento, em torno de  $-40^{\circ}\text{C}$ ) a uma velocidade de congelamento controlada (1 a  $10^{\circ}\text{C}/\text{hora}$ ), usando um congelador programável, seguida de imersão direta em nitrogênio líquido (Engelmann, 1997). O congelamento lento ocorre na presença de uma solução de crioprotetores, geralmente contendo DMSO (dimetilsulfóxido) à concentração de 5 a 15%. O congelamento lento é uma técnica clássica, sendo o primeiro protocolo desenvolvido para tecidos de plantas hidratados. Entretanto, devido ao fato de ser operacionalmente complexa, uma vez que requer a utilização de congeladores programáveis caros e sofisticados, atualmente esta técnica é aplicada somente para criopreservação de tecidos não organizados, como suspensões celulares e calos (Panis e Lambardi, 2005).

No congelamento rápido, o tecido encapsulado, ou não, é primeiramente induzido à vitrificação citoplasmática através de dois processos: i) pré-cultivo em meio MS líquido com alta concentração de sacarose, seguido da desidratação ao ar, em câmara de fluxo laminar ou em sílica gel; e ii) tratamento com crioprotetores químicos. Após passar por um desses processos o tecido pode ser mergulhado diretamente em nitrogênio líquido, eliminando, assim, a necessidade de uso dos congeladores programáveis (Luan, 2001).

Durante o rápido decréscimo da temperatura, não há tempo suficiente para o crescimento de cristais de gelo no espaço intracelular. Assim, as células passam rapidamente pela zona de temperatura, na qual o crescimento letal de cristais de gelo ocorreria (Santos, 2000). O congelamento rápido é uma técnica, que vem sendo utilizada com sucesso em tecidos mais organizados, como ápices caulinares, meristemas e embriões.

## 2.5 – Descongelamento

O descongelamento deve ser conduzido de forma criteriosa, evitando-se ao máximo as condições para a formação de cristais de gelo no interior das células. Segundo Karlsson (2001), processos inadequados de descongelamento causam, na maioria das vezes, danos às células e tecidos criopreservados. Supõe-se que estas injúrias sejam resultantes do processo de desvitrificação do conteúdo citosólico, o que leva à formação e ao crescimento de cristais de gelo no interior das células. A maioria dos protocolos de descongelamento, adotados experimentalmente em trabalhos de criopreservação, são baseados no descongelamento rápido, através da imersão das amostras congeladas em banho-maria mantido a 40°C. Segundo Engelmann (1997), com o descongelamento rápido, não há tempo hábil para a formação de cristais de gelo, redundando em maior sobrevivência de espécimes criopreservados. Entretanto, outros métodos de descongelamento podem ser utilizados. Por exemplo, Dumet et al. (2002) utilizaram o descongelamento em solução de 0,75 M de sacarose. Segundo esses autores, o índice de sobrevivência neste método foi superior ao obtido pelo método de descongelamento rápido.

Leunufna e Keller (2003) apresentaram um método alternativo em que o meristema apical do inhome, antes de ser congelado, é coberto com uma gotícula de uma solução crioprotetora de PVS2 (Solução de Vitrificação de Planta n° 2) e envolvido por pequenos pedaços de papel alumínio. Este método resultou em maior índice de sobrevivência, em comparação com o protocolo normal de vitrificação. O sucesso foi atribuído à distribuição de calor, que foi mais rápida e uniforme nas pequenas gotículas.

## 2.6 – Regeneração

A última etapa da criopreservação é a regeneração. O processo de regeneração ideal é aquele que propicia a recuperação de maior quantidade de células vivas e que induz à formação de uma nova planta, que expresse suas características genéticas (Lopes, 2005). Métodos de avaliação por coloração, como os testes de tetrazólio e de diacetato de fluoresceína, têm sido usados para avaliar a viabilidade de sementes, tecidos e células congeladas. É importante mencionar que estes métodos podem dar informação incorreta quanto à viabilidade. Células podem dar reação de coloração positiva imediatamente após o descongelamento, mas eventualmente morrem, quando colocadas em cultura (Santos, 2000). Células que foram parcialmente danificadas pelo congelamento podem dar reação de coloração negativa, mas se recuperam e retomam crescimento após um tempo em meio de reestabelecimento (Bajaj, 1995). Portanto, a única evidência sobre a viabilidade do material submetido à criopreservação é a retomada do crescimento e a regeneração de um novo indivíduo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTSCHWAGER, E.; BRANDES, E.W. **Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.)**. Washington: USDA, 1958. 307p. (Agriculture Handbook, 122).

BACCHI, O.O.S. Botânica da cana-de-açúcar. In: ORLANDO FILHO J., Coord. **Nutrição e adubação da cana-de-açúcar no Brasil**. Piracicaba: IAA/PLANALSUCAR, 25-37, 1983. (Coleção PLANALSUCAR, 2).

BAJAJ, Y.P.S. Cryopreservation of plant cell, tissue, organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. **Biotechnology in agriculture and forestry**, 32: 3-47, 1995.

BSRI. Bangladesh Sugarcane Research Institute. <<http://www.bsri.gov.bd>>, acessado em: 19/07/2008.

CARVALHO, J.M.F.C.; VIDAL, M.S. Crioconservação no melhoramento vegetal. **Documentos 115**. Embrapa algodão. Campina Grande, 2003.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento, **Acompanhamento da Safra Brasileira Cana-de-Açúcar Safra 2008, primeiro levantamento, abril/2008**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/cana.pdf>>. Acesso em: 26 jun. 2008.

DEREUDDRE, J.; BLANDIN, S.; HASSEN, N. Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to desiccation and freezing in liquid nitrogen: 1. Effects of preculture. **Cryo-Letters**, 12: 125-134, 1991.

DUMET, D.; GRAPIN, A.; BAILLY, C.; DORION, N. Revisiting crucial steps of an encapsulation/desiccation based cryopreservation process: importance of thawing method in the case of *Pelargonium* meristems. **Plant Science**, 163: 1121-1127, 2002.

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation methods. In: CALLOW J.A.; FORD-LLOYD, B.V.; NEWBURY H.J. (eds.). **Biotechnology and plant genetic resources**. Rome: CAB International, 119-161, 1997.

ENGELMANN, F. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (eds.) **Cryopreservation of tropical plant germplasm**. IPGRI, Tsukuba: Japan, 8-20, 1998.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 40 (5): 427-433, 2004.

FABRE, J.; DEREUDDRE, J. Encapsulation/dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. **Cryo-Letters**, 11: 413-426, 1990.

GONZALEZ-ARNAO, M.T.; PANTA, A.; ROCA, W.M.; ESCOBAR, R.H.; ENGELMANN, F. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 92: 1-13, 2008.

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

HOEKSTRA, F.; GOLOVINA, E.A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, 6: 431-438, 2001 a.

HOEKSTRA, F.; GOLOVINA, E.A.; TETTEROO, F. A.; WOLKERS, W. F. Induction of desiccation tolerance in plant somatic embryos: how exclusive is the protective role of sugars? **Cryobiology**, 43: 140-150, 2001 b.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=1068&id\\_pagina=1](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1068&id_pagina=1)>. Acesso em: 10 jun. 2008.

JESWIET, J. Beschrijving der soorten van het swikerriet. Elf de bijdrage. Bijdrage tot de systematiek van het geslacht *Saccharum*. Meded Proefst. Java - **Suikerind**: 391-404, 1925.

KARLSSON, J.O.M. A theoretical model of intracellular devitrification. **Cryobiology**, 42: 154-169, 2001.

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

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

KRAMER, P.J.; BOYER, J.S. **Water relations of plants and soils**. Academic Press, San Diego, CA, pp 495, 1995.

LEMOS, E.E.P.; FERREIRA, M.S.; ALENCAR, L.M.C.; NETO, C.E.R.; ALBUQUERQUE, M.M. Conservação in vitro de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 37(10): 1359-1364, 2002.

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, 37-56, 1990.

LEUNUFNA, S.; KELLER, E. R. J. Investigating a new cryopreservation protocol for yams (*Dioscorea* spp.). **Plant Cell Reports**, 21:1159–1166; 2003.

LOPES, K.P. **Criopreservação de germoplasma de oleaginosas de importância econômica para o nordeste brasileiro**. Tese (Doutorado em Agronomia), Areia, UFPB, 2005. 131 f.

LOPES, V.R. **Divergência genética entre clones de cana-de-açúcar da serie RB97**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Curitiba, UFPR, 2007. 87 f.

LUAN, H.Y. *In Vitro* Conservation and Cryopreservation of Plant Genetic Resources. In: SAAD, S.M.; RAO, V.R. (eds.) **Establishment and Management of Field Genebank, a Training Manual**. IPGRI-APO, Serdang: 54-58, 2001.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; ARIZONO, H. E.; CALHEIROS, G.G. Hibridação da cana-de-açúcar. In: BORÉM, A. (ed.) **Hibridação Artificial em Plantas**. UFV, Viçosa: Editora UFV, 221-254, 1999.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON “THE ROLE OF BIOTECHNOLOGY FOR THE CHARACTERISATION AND CONSERVATION OF CROP, FORESTRY, ANIMAL AND FISHERY GENETIC RESOURCES”. Turin, Italy, 43-54, 2005.

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**, 14: 309-320, 1993.

POPOV, A.S.; POPOVA, E.V.; NIKISHINA, T.V.; VYSOTSKAYA, O.N. Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences. **International Journal of Refrigeration**, 29: 403-410, 2006.

REED, B.M.; SCHUMACHER, L.; DUMET, D.; BENSON, E.E. Evaluation of a modified encapsulation–dehydration procedure incorporating sucrose pretreatments for the cryopreservation of ribes germplasm. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 41: 431-436, 2005.

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

SAKAI, A. Development of cryopreservation techniques. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (eds.) **Cryopreservation of tropical plant germplasm**. IPGRI, Tsukuba: Japan, 1-7, 1998.

SAKAI, A. Plant cryopreservation. In: FULLER, B.; LANE, N.; BENSON, E. E. (eds.) **Life in the frozen state**. London: CRC Press, 329–346, 2004.

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

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

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**, 29: 691-700, 1992.

SEAAAP. Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca. Disponível em: <<http://www.seag.es.gov.br/cana.htm>>. Acesso em: 24 nov. 2006.

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

STEVENSON, G.C. **Genetics and breeding of sugarcane**. London: Longmans, 284 p., 1965.

USDA. United States Department of Agriculture. Disponível em: <<http://www.usda.gov/>>. Acesso em 19 jul. 2008.

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

VERLEYSSEN, H.; BOCKSTAELE, E.V.; DEBERGH, P. An encapsulation–dehydration protocol for cryopreservation of the azalea cultivar ‘Nordlicht’ (*Rhododendron simsii* Planch.). **Scientia Horticulturae**, 106: 402–414, 2005.

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

WALKER, D.I.T. Trends in sugarcane breeding. In: ABBOTT, A.J.; ATKIN, R.K. (eds.) **Improving vegetative propagated crops**. Bristol: Academic Press, 3-26, 1987.

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

WITHERS, L.A.; ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of plant genetic resources. In: ALTMAN, A. (ed.) **Agricultural Biotechnology**. New York, Marcel Dekker, 57-88, 1998.

---

**ESTUDO DO PRÉ-CULTIVO EM MEIO ENRIQUECIDO COM SACAROSE  
NA AQUISIÇÃO DE TOLERÂNCIA DOS TECIDOS DA VARIEDADE DE  
CANA-DE-AÇÚCAR RB72454 À SECAGEM**

**1 – INTRODUÇÃO**

Em várias espécies, os açúcares são considerados importantes na aquisição de tolerância dos tecidos à secagem e ao congelamento (Lenné et al., 2007). Dissacarídeos são acumulados por organismos de todos os reinos em resposta a diferentes tipos de estresses, como o estresse devido à temperatura, o estresse oxidativo e o osmótico. Em condições de estresse devido ao frio e à seca, alguns organismos acumulam trealose para proteger as proteínas e os lipídeos da membrana (Bogaart et al., 2007). Plantas superiores frequentemente acumulam sacarose ao invés de trealose (Hoekstra et al., 2001a).

A habilidade dos açúcares em proteger a bicamada lipídica e as proteínas, durante a secagem e o congelamento, é alvo de vários estudos. Durante a secagem, as membranas são induzidas à transição da fase líquida cristalina para a fase gel, o que gera vazamento de solutos, fusão de membrana e a desnaturação das proteínas da membrana. O efeito protetor dos açúcares ocorre de duas maneiras: i) pela formação de uma matriz vítrea; e ii) através da interação direta entre os lipídios e os açúcares (Koster et al., 2000; Crowe et al., 2001; Cacula e Hinch, 2006). Com a formação desta matriz vítrea, os açúcares formam uma camada de hidratação vítrea amorfa, que impede os rompimentos mecânicos e a desnaturação das proteínas da membrana. Crowe e Crowe (1986) concluíram que os grupos OH dos açúcares substituem a água e interagem com os fosfolipídios da membrana, formando as ligações de hidrogênio. Esta interação ajuda a estabilizar as membranas celulares durante a desidratação e congelamento e a manter a integridade e função através da minimização dos danos na camada dupla de lipídios. Bogaart et al. (2007), usando a correlação de espectroscopia de fluorescência, concluíram que a sacarose diminui a mobilidade dos fosfolipídios na membrana líquido-cristalina e que este açúcar possui uma forte interação com os lipídios de membrana.

A técnica do encapsulamento-desidratação foi desenvolvida por Fabre e Dereuddre (1990) e baseia-se na tecnologia desenvolvida para a produção de sementes artificiais. A técnica consiste no encapsulamento do explante em gel de alginato de sódio, permitindo que os explantes sejam eficientemente protegidos durante a

desidratação (Verleysen et al., 2005). Esta técnica facilita a manipulação dos explantes *in vitro*, além de combinar dois procedimentos crioprotetores, que são o pré-cultivo com sacarose e a secagem ao ar em câmara de fluxo laminar (Martínez et al., 1999). Após o pré-cultivo e a secagem realizada ao ar da câmara de fluxo laminar ou com sílica gel, os explantes encapsulados são, diretamente, imersos em nitrogênio líquido e descongelados lentamente (Engelmann, 1998).

O teor de umidade dos ápices caulinares encapsulados, para se obter maior taxa de sobrevivência, varia entre as espécies vegetais, devido à diferença na tolerância à desidratação, que é geralmente em torno de 20% (Withers e Engelmann, 1998). Entretanto, taxas de sobrevivência acima de 90% foram obtidas para gemas axilares de genciana (*Gentianella amarella*), desidratadas para um teor de umidade de 10% (Suzuki et al., 1998), enquanto a taxa de regeneração de ápices caulinares de maçã variou entre 70 e 90%, dependendo do acesso, quando o teor de umidade dos ápices caulinares encapsulados era em torno de 30% (Zhao et al., 1999).

O pré-cultivo dos explantes encapsulados em meio de cultura líquido, com elevada concentração de sacarose (0,1 a 1,5 M) ocorre por um período de tempo que, normalmente, varia de um a dois dias. O pré-cultivo é importante para induzir a tolerância dos tecidos ou órgãos vegetais à secagem e ao congelamento, sendo um passo importante para obtenção de um maior índice de sobrevivência na criopreservação (Sakai, 1998).

O objetivo deste estudo foi determinar o efeito da concentração de sacarose e do tempo de pré-cultivo sobre a resistência dos tecidos à secagem.

## **2 – MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos e Células Vegetais do Setor de Fruticultura do Departamento de Fitotecnia e no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

## 2.1 – Estabelecimento *in vitro*

Para o estabelecimento *in vitro*, foram utilizadas ponteiros de aproximadamente 60 cm de comprimento, coletadas de plantas adultas da variedade RB72454.

Após a coleta, as folhas mais externas das ponteiros foram eliminadas uma a uma até a visualização do último nó. As ponteiros foram reduzidas à região do ápice caulinar (explante), com aproximadamente 7,0 cm de comprimento e 0,8 cm de diâmetro. Os explantes extraídos foram mantidos mergulhados em água deionizada, para evitar a desidratação. Posteriormente, os explantes foram lavados em água com detergente na concentração 1:1 durante 10 minutos, sendo então pré-desinfestados da seguinte forma: 10 minutos em Cercobin 700 2,5% (p/v); 20 minutos em água sanitária comercial (2,0 a 2,5% de cloro ativo) (p/v) diluído em água deionizada em uma concentração de 1:1. Entre a primeira e a segunda desinfestação, os explantes foram enxaguados em água corrente e, após a terceira desinfestação, em água destilada autoclavada por três vezes. Logo após a pré-desinfestação, foram extraídos dois pares de folhas de cada explante.

Os explantes foram levados para câmara de fluxo laminar e desinfestados em álcool 70% (v/v) durante 1 minuto, em bicloreto de mercúrio 0,01% (p/v) durante 20 minutos e em água sanitária comercial (2,0 a 2,5% de cloro ativo) (p/v) durante 20 minutos. Entre cada etapa, os explantes foram enxaguados três vezes com água destilada autoclavada. Em seguida, com o auxílio de pinça e bisturi esterilizados, foram retiradas todas as partes escurecidas dos tecidos. Os explantes foram reduzidos a 3,0 cm de comprimento por 0,4 cm de diâmetro e inoculados, individualmente, em tubos de ensaios de dimensão 25 x 150 mm com tampa de polipropileno contendo 10 ml de meio básico (MB).

O MB foi constituído por sais, nutrientes orgânicos e vitaminas de Murashige & Skoog (MS, 1962) e acrescido de 30 g/L de sacarose, 100 mg/L de mio-inositol, 100 mg/L de ácido cítrico, 40 mg/L de cisteína, 15 mg/L de ácido ascórbico, 2,0 mg/L de nitrato de prata, solidificado com 7,0 g/L de ágar (Ágar-Ágar Merck purificado e livre de inibidores para microbiologia), 1,16 µM de cinetina, e 2,22 µM de 6-benzilaminopurina (BAP). O pH do meio foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  antes da adição do ágar e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5 atm durante 20 minutos. Os explantes foram incubados em sala com temperatura controlada de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16

horas e irradiância de  $\pm 52 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram, luz do dia, 40 W).

Após sua emissão, os perfilhos ( $\pm 4$  perfilhos) foram repicados e transferidos para frascos de 350 ml (1 perfilho/frasco) com tampas de polipropileno, contendo 30 ml do MB. As plantas foram incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente e repicadas a cada 25 dias até a obtenção do material necessário para realização dos experimentos, constituído de ápices caulinares com 3 a 4 primórdios foliares e uma parte basal.

## 2.2 – Encapsulamento

Os ápices caulinares medindo entre 3 e 4 mm foram extraídos, assepticamente, com auxílio de pinça e bisturi, a olho nu, de brotos que mediam de 8 a 10 cm, aos 15 dias após sua última repicagem. Os ápices caulinares extraídos eram mantidos em placa de Petri de vidro estéril, contendo papel toalha umedecido com água deionizada, para evitar sua desidratação até que fossem extraídos todos os ápices necessários. Em seguida foram transferidos para o MB sem a presença dos reguladores de crescimento, onde permaneciam durante 12 horas para recuperação do estresse gerado em sua extração.

Após este período, os ápices foram transferidos para o MB, sem cálcio e reguladores de crescimento, contendo 3% (p/v) de ácido algínico sal sódico (Sigma) de baixa viscosidade. Usando uma micropipeta de 5.000  $\mu\text{l}$  com ponteira estéril, os ápices foram capturados com 500  $\mu\text{l}$  do meio de cultura e colocados para polimerizar durante 10 minutos em uma solução de 100 mM de nitrato de cálcio. Cada cápsula (7-8 mm) continha um ápice caulinar.

## 2.3 – Determinação do teor de umidade das cápsulas e validação

Após a polimerização, as cápsulas foram secas superficialmente em papel toalha e transferidas para placas de Petri de vidro estéril (90 X 18 mm). Antes do início da secagem, os ápices encapsulados foram pesados em uma balança analítica para obtenção da massa fresca no tempo zero. Após a pesagem, deu-se início à secagem. As placas de Petri foram mantidas semi-abertas em uma câmara de fluxo laminar com a temperatura ambiente e a umidade relativa do ar de  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $61 \pm 8\%$ , respectivamente. A perda

de massa das cápsulas foi monitorada, utilizando-se uma balança analítica, em intervalos regulares de uma em uma hora nas primeiras nove horas, de duas em duas horas no intervalo entre 9 e 15 horas e de três em três horas no intervalo entre 15 e 21 horas, obtendo-se a massa fresca para cada período de tempo. Após 21 h de secagem, as placas de Petri contendo as cápsulas foram levadas à estufa de circulação de ar forçada a 70°C durante 72h para a obtenção da massa seca. O teor de umidade foi determinado pela diferença entre a massa fresca (MF) e a massa seca (MS) calculado da seguinte forma:

$$[(MF - MS)/MF] \times 100\%$$

O ensaio constou de nove repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri contendo 20 cápsulas. Os resultados foram analisados e interpretados, utilizando-se o software livre R (R Development Core Team, 2007). Os pontos médios de cada tempo avaliado foram unidos por segmentos de reta, traçando-se uma linha de tendência de perda de umidade. Posteriormente, com o auxílio de linhas horizontais referentes aos teores de umidade de interesse (30, 20 e 10%) foram identificados os tempos de secagem correspondentes diretamente no gráfico.

Após a determinação do tempo de exposição dos ápices caulinares encapsulados ao ar da câmara de fluxo laminar para a obtenção dos teores de umidade de 30, 20 e 10%, realizou-se a validação dos resultados obtidos. A validação constou de nove repetições, sendo cada repetição uma placa de Petri de vidro contendo 20 cápsulas. As cápsulas foram expostas aos períodos de tempo pré-determinados para obtenção dos teores de umidade de 30, 20 e 10%.

#### 2.4 – Determinação do teor de umidade das cápsulas quando pré-cultivadas em diferentes concentrações de sacarose

A sacarose possui potencial osmótico, que induz à perda de umidade do material, quando exposto à solução contendo sacarose (Martinez et al., 1999). Considerando esta característica da sacarose, procurou-se verificar a perda de umidade sofrida pelas cápsulas, quando expostas às diferentes concentrações de sacarose adotadas.

O teor de umidade das cápsulas, quando pré-cultivadas nas diferentes concentrações de sacarose, foi analisado em oito repetições (20 cápsulas/repetição). Após pré-cultivadas, as cápsulas foram secas superficialmente em papel toalha e transferidas para placas de Petri de vidro (90 X 18 mm). As amostras foram expostas à secagem durante 0; 5,7; 7,45 e 10,1 horas, correspondentes ao tempo necessário de exposição na câmara de fluxo laminar para obtenção dos teores umidade de 30, 20 e 10%. Após cada um desses períodos, as placas contendo as cápsulas foram pesadas para obtenção da massa fresca. Após a última leitura, as placas foram levadas para estufa de circulação de ar forçada a 70°C, onde permaneceram durante 72 horas para obtenção da massa seca. O teor de umidade foi determinado pela diferença entre a massa fresca (MF) e a massa seca (MS), conforme descrito anteriormente.

## 2.5 – Pré-cultivo, secagem e teste de viabilidade

Após a polimerização, os ápices caulinares encapsulados foram transferidos para meio MS basal líquido enriquecido com 0,3; 0,5 e 0,75 M de sacarose, no qual permaneceram durante um e dois dias, a fim de induzir a tolerância dos ápices caulinares à secagem. Um total de 24 tratamentos foram obtidos, gerando um fatorial 3x2x4 (concentração de sacarose X dias de pré-cultivo X tempo de secagem) (Tabela 1). Os frascos contendo as cápsulas (30 cápsulas/frasco) com 30ml dos diferentes meios de pré-cultivo foram mantidos sob agitação (80 rpm) em agitador orbital durante um e dois dias em sala com temperatura controlada de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ . Antes da secagem, as cápsulas foram secas superficialmente em papel toalha estéril e transferidas para placas de Petri de vidro (90 X 18 mm), que foram mantidas semi-abertas para secagem durante 0; 5,7; 7,45 e 10,1 horas em exposição ao ar em câmara de fluxo laminar. Estes períodos de tempo correspondem ao tempo necessário de exposição na câmara de fluxo laminar para obtenção dos teores umidade de 30, 20 e 10%. Após os diferentes tempos de secagem, as cápsulas foram transferidas para frascos contendo MB. Foram utilizadas três repetições por tratamento, sendo que cada repetição consistiu de um frasco contendo sete a dez ápices caulinares encapsulados. Os frascos foram mantidos no escuro durante sete dias e, após esse período, foram transferidos para o claro, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram, luz do dia, 40 W). O teste de viabilidade foi feito a cada três dias por duas semanas e, na terceira

semana, foi realizada a última leitura. Os ápices caulinares foram considerados vivos, quando houve alongamento dos primórdios foliares.

O experimento foi organizado em um esquema fatorial 3X2X4 (três concentrações de sacarose, dois tempos de pré-cultivo e quatro tempos de secagem) segundo o delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Os dados do índice de sobrevivência foram analisados e interpretados, utilizando-se o software livre R (R Development Core Team, 2007). Foi realizada a análise de variância e, quando necessário, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

## 2.6 – Análise histológica

Para as análises histológicas, três ápices caulinares foram coletados, após cada um dos seguintes passos: extração; 12 horas em meio MB; um e dois dias de pré-cultivo em solução contendo 0,3; 0,5 e 0,75 M de sacarose; secagem ao ar da câmara de fluxo laminar durante 0; 5,7; 7,45 e 10,1 horas; após 0 e 3 dias em meio de reestabelecimento. Os ápices caulinares foram removidos de suas cápsulas antes de serem processados para a microscopia. As amostras foram fixadas em FAA<sub>50</sub> durante 48 horas à temperatura ambiente e estocadas em etanol 70% (Jonhansen, 1940). O material foi desidratado em série etílica crescente e incluído em metacrilato (Historesin-Leica), de acordo com as recomendações do fabricante. O material embocado foi seccionado, transversal e longitudinalmente, em micrótomo rotativo com 4 µm de espessura. O material foi corado com azul de toluidina (O' Brien et al., 1964) para metacromasia, e também com lugol (Johansen, 1940) diluído (1:5) para detecção de amido, sendo então montado sob lamínula com resina sintética (Permout). O laminário foi analisado em microscopia de luz, enquanto as imagens digitalizadas foram obtidas por meio de um fotomicroscópio (Olympus AX70) com sistema U-photo, câmera e microcomputador com o software Spot-Basic.

**Tabela 1.** Combinação da concentração de sacarose X tempo de pré-cultivo X tempo de secagem utilizada na indução de tolerância à secagem e ao congelamento, em ápices caulinares de cana-de-açúcar encapsulados

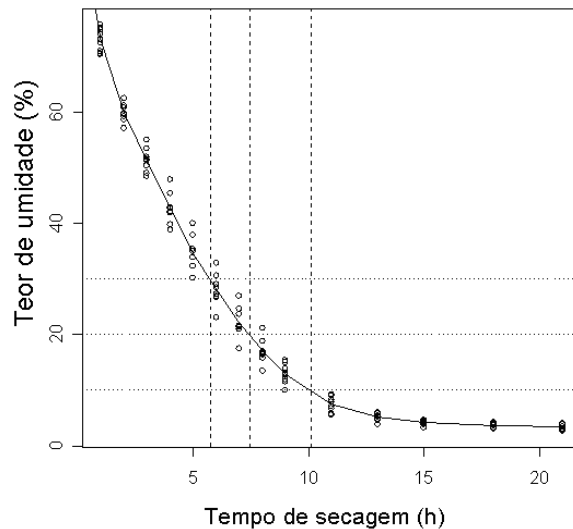
Tratamento	Concentração de sacarose (M)	Tempo de pré-cultivo (dias)	Tempo de secagem (h)
T <sub>0</sub>	-	-	0
T <sub>1</sub>	-	-	5,7
T <sub>2</sub>	-	-	7,45
T <sub>3</sub>	-	-	10,1
T <sub>4</sub>	0,3	1	0
T <sub>5</sub>	0,3	1	5,7
T <sub>6</sub>	0,3	1	7,45
T <sub>7</sub>	0,3	1	10,1
T <sub>8</sub>	0,3	2	0
T <sub>9</sub>	0,3	2	5,7
T <sub>10</sub>	0,3	2	7,45
T <sub>11</sub>	0,3	2	10,1
T <sub>12</sub>	0,5	1	0
T <sub>13</sub>	0,5	1	5,7
T <sub>14</sub>	0,5	1	7,45
T <sub>15</sub>	0,5	1	10,1
T <sub>16</sub>	0,5	2	0
T <sub>17</sub>	0,5	2	5,7
T <sub>18</sub>	0,5	2	7,45
T <sub>19</sub>	0,5	2	10,1
T <sub>20</sub>	0,75	1	0
T <sub>21</sub>	0,75	1	5,7
T <sub>22</sub>	0,75	1	7,45
T <sub>23</sub>	0,75	1	10,1
T <sub>24</sub>	0,75	2	0
T <sub>25</sub>	0,75	2	5,7
T <sub>26</sub>	0,75	2	7,45
T <sub>27</sub>	0,75	2	10,1

### 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 – Determinação dos teores de umidade após a exposição dos ápices caulinares encapsulados à secagem

Na curva potencial que representa a queda acentuada do teor de água das cápsulas, quando submetidas à secagem, a média do teor de água inicial foi de 96,59%. Esta média foi reduzida a 42,65% após 4 horas, a 17,21% após 8 horas, a 4,21% após 15 horas e a 3,59% após 21 horas de secagem (Fig. 1). Isso significa que, em 4 horas, o teor de água foi reduzido em 55,84%, em 8 horas a 82,18%, e após 21 horas este teor foi reduzido em 96,28%. A partir de 15 horas até 21 horas de secagem, o teor de água médio se estabilizou em torno de 4,2% e 3,69%, respectivamente (Fig. 1).

Os teores de umidade pré-determinados de 30, 20 e 10% foram alcançados após 5,7; 7,45 e 10,1h, respectivamente (Figura 1). Os teores de umidade das cápsulas variaram entre os diferentes trabalhos, que usaram secagem ao ar em câmara de fluxo laminar. O teor de umidade de 33,33% foi atingido após 6 horas de secagem para ápices caulinares encapsulados de cana-de-açúcar (Paulet et al., 1993). Os teores de umidade de 23 e 19% foram atingidos após 5 e 7 horas, respectivamente, para ápices caulinares encapsulados de grama-seda (Reed et al., 2005a). Foram necessárias 6, 8 e 10 horas de exposição dos ápices caulinares encapsulados de videira à câmara de fluxo laminar, para obtenção dos teores de umidade de 17,6; 15,6 e 15,1%, respectivamente (Wang et al., 2000). A variação no teor de umidade das cápsulas entre os diferentes trabalhos é, provavelmente, devido à temperatura e à umidade relativa do ar onde a secagem foi realizada, bem como ao tamanho e ao tempo de polimerização das cápsulas.



**Figura 1.** Curva representativa da variação no teor de umidade das cápsulas em função do tempo de secagem, destacando o tempo de exposição ao ar em câmara de fluxo laminar para obtenção dos teores de umidade de 30, 20 e 10%.

Segundo Reed et al. (2005b) e Panis e Lambardi (2005), quando o material é seco ao ar em câmara de fluxo laminar, normalmente não há nenhum controle da temperatura nem da umidade relativa do ar onde a secagem está sendo realizada. A temperatura e a umidade relativa do ar influenciam fortemente a taxa de evaporação, o que explica a diferença observada no teor de umidade final das cápsulas, entre os diferentes trabalhos, quando o mesmo período de tempo de secagem é utilizado. Reed et al. (2005b) recomendam o uso de um método de secagem, em que sejam utilizados frascos vedados contendo uma quantidade fixa de sílica gel para obtenção de resultados mais precisos e confiáveis. Wang et al. (2000), comparando os efeitos da secagem com sílica gel e ao ar em câmara de fluxo laminar para ápices caulinares encapsulados de videira criopreservados, concluíram que a sobrevivência foi dependente do teor de umidade e não do método de secagem. Entretanto, os autores preferem a adoção do método de secagem ao ar, uma vez que a secagem obtida com o uso de sílica gel requer um teor de umidade inicial padronizado e também devido ao fato de o uso deste método ser mais laborioso.

Como o tamanho e o tempo de polimerização influenciam o teor de umidade das cápsulas (Block, 2003) para se obter resultados que sejam reproduzíveis, torna-se necessária a padronização do tamanho e do tempo de polimerização das mesmas. No presente trabalho, padronizou-se tanto a temperatura da sala onde a secagem foi realizada em  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , o que foi possível através do uso de um aparelho de ar

condicionado, quanto o tamanho das cápsulas em 7-8 mm de diâmetro e o tempo de polimerização das cápsulas em 10 minutos. Essas padronizações contribuíram para a confiabilidade dos resultados, confirmados pela validação.

A perda de umidade foi maior no início da secagem, diminuindo à medida que o tempo de exposição do encapsulado ao ar da câmara de fluxo laminar aumentava (Figura 1). Isto é explicado pelo fato que, durante a secagem, a perda de umidade ocorre devido à movimentação da água, que resulta de uma diferença de pressão de vapor d'água entre a superfície do produto e o ar que o envolve (Martinazzo et al., 2007). Assim, a remoção d'água ocorre da superfície para o interior da massa e, conseqüentemente, a superfície seca primeiro e dificulta a passagem da água do interior da massa para o meio exterior.

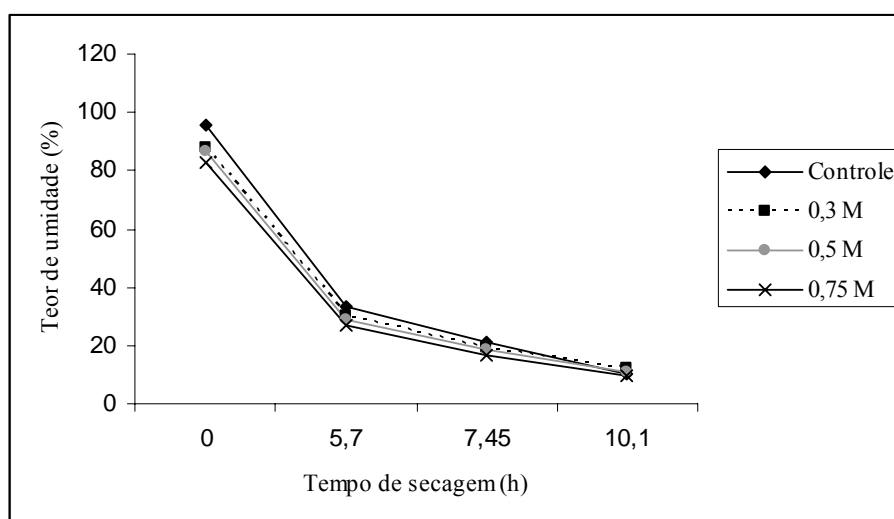
A perda de umidade durante o processo da secagem causou mudanças nas cápsulas e nos ápices caulinares. As cápsulas tiveram seu diâmetro reduzido, adquiriram uma cor mais escura devido ao aumento na concentração de seus solutos (Figura 2C). No final da leitura, os ápices caulinares apresentavam regiões necrosadas (Figura 2C), sendo esta uma reação dos tecidos ao estresse gerado pela secagem.



**Figura 2.** Ápices caulinares de cana-de-açúcar encapsulados expostos à secagem. A: aspecto das cápsulas e dos explantes antes da exposição à secagem, umidade inicial. B: cápsulas após 10 horas de secagem. C: cápsulas e ápices caulinares após 21 horas de secagem. Observar a cor mais escura (amarelada) adquirida pelas cápsulas e pontos necrosados nos ápices caulinares em C.

### 3.2 – Efeito da concentração de sacarose na perda de umidade dos ápices caulinares encapsulados

O teor de umidade inicial dos ápices caulinares encapsulados foi maior no tratamento-controle, reduzindo com o aumento na concentração de sacarose na solução de pré-cultivo. Após iniciada a secagem, a perda de umidade das cápsulas apresentou tendência-padrão, independentemente da concentração de sacarose adotada (Figura 3).



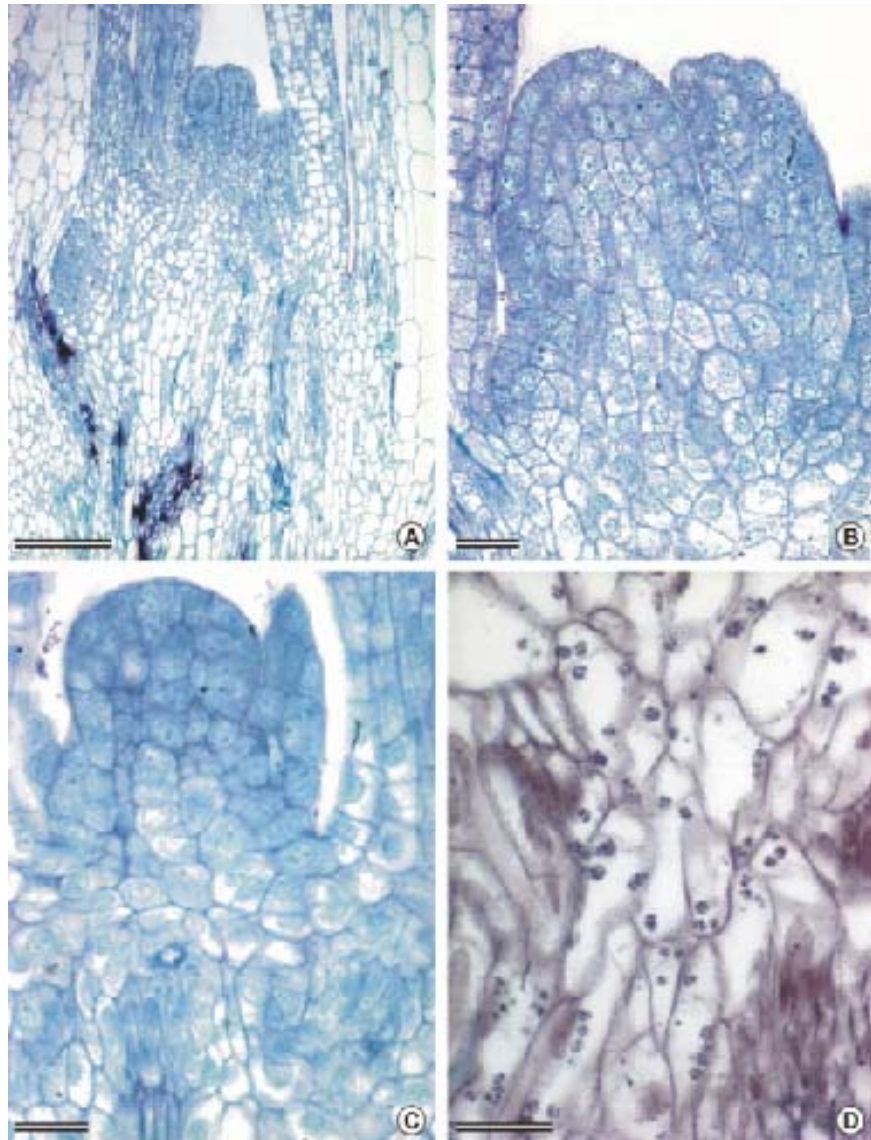
**Figura 3.** Efeito dos vários tempos de secagem (0; 5,7; 7,45 e 10,1 horas) em câmara de fluxo laminar no teor de umidade dos ápices caulinares encapsulados, pré-cultivados ou não em meio de cultura enriquecido com 0,3; 0,5 e 0,75 M de sacarose.

Quando expostas à secagem, as cápsulas que foram pré-cultivadas perderam, em média, menos teores de umidade que o tratamento-controle (Figura 3). Estes resultados indicam que, durante o pré-cultivo, ocorreu absorção de sacarose pelas cápsulas de alginato e também pelas células dos ápices caulinares, o que resultou na redução do teor de umidade. Adela e Deliu (2006) observaram que a massa fresca das cápsulas pré-cultivadas em meio enriquecido com sacarose foi maior do que a massa daquelas que não pré-cultivadas. A absorção de sacarose pelas células foi observada indiretamente, através da visualização de maior síntese e acúmulo de amido intracelularmente, após um dia de pré-cultivo em meio de cultura enriquecido com 0,3; 0,5 e 0,75 M de sacarose (dados não apresentados). Este comportamento também foi observado para café (Mari et al., 1995), banana (Panis et al., 1996) e ápices caulinares de palmeira (Bagniol et al.,

1992). Hitmi et al. (1999) demonstraram que a sacarose diminui o teor de umidade em ápices caulinares de *Chrysanthemum cinerariaefolium*, devido à sua ação osmótica, melhorando sua tolerância ao congelamento. A perda de umidade não é apenas devido ao resultado da ação osmótica da sacarose, mas também devido sua capacidade de entrar em grandes quantidades nas células. Como resultado de sua atuação, o ponto de congelamento e a quantidade de água congelável presente nos tecidos diminuem.

As análises histológicas revelaram também as características dos ápices caulinares-controle (Figuras 4A e 4B), e após 12 horas em MB (Figuras 4C e 4D). O ápice-controle constou de vários primórdios foliares de uma região apical e de uma parte basal. As células da região apical apresentaram características meristemáticas típicas: alta relação núcleo/citoplasma, citoplasma denso, pequenos vacúolos, núcleo volumoso com um ou dois nucléolos aparentes. As células da região basal eram mais volumosas e altamente vacuolizadas, seu citoplasma era pouco denso e apresentavam baixa relação núcleo/citoplasma. Tanto as células da região apical quanto da basal não apresentaram acúmulo de grãos de amido.

Após 12 horas em meio de cultura básico, foi observado um acúmulo de grãos de amido nas células adjacentes aos cordões procambiais da porção basal (Figura 4 D). Tanto as células da região apical quanto da porção basal, com exceção da presença dos grãos de amido, mantiveram as características apresentadas pelo controle (Figura 4 C). Esta observação demonstra que o cultivo dos ápices caulinares em meio básico (MB) durante 12 horas confere, além da recuperação do estresse gerado pela extração a reativação do metabolismo mediante o acúmulo de grãos de amido em suas células. Isto foi observado para *Phoenix dactylifera* (Bagniol et al., 1992), *Coffea racemosa* e *C. sessiliflora* (Mari et al., 1995). Esta etapa é também importante para reduzir a heterogeneidade fisiológica dos ápices pela sincronização de seu metabolismo (Benson et al., 1989).



**Figura 4.** Seções longitudinais de ápices caulinares de cana-de-açúcar. A-B: controle, imediatamente após a extração. C-D: após 12 horas em MB. Nota-se a presença de grãos de amido, corados de negro, em D. Barra = 200  $\mu\text{m}$  (A), 25  $\mu\text{m}$  (B-D).

### 3.3 – Efeito das diferentes concentrações de sacarose na aquisição de tolerância à secagem

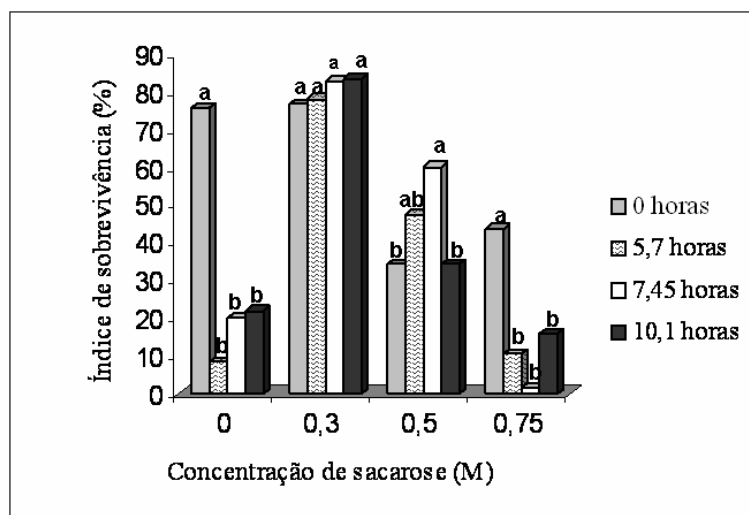
Não houve efeito significativo da interação tripla (concentração X tempo de pré-cultivo X tempo de secagem) e da interação dupla (tempo de pré-cultivo X tempo de secagem) (Tabela 2). As demais interações foram significativas e foram decompostas.

**Tabela 2.** Resumo da análise de variância do índice de sobrevivência dos explantes

F.V.	G.L.	Q.M.
Concentração	3	1,649***
Tempo de pré-cultivo	1	0,082*
Tempo de secagem	3	0,098**
Conc.XTempo de pré-cultivo	2	0,063*
Conc.XTempo de secagem	9	0,154***
Tempo de pré-cultivoXTempo de secagem	3	0,042 <sup>ns</sup>
Conc.XTempo de pré-cultivoXTempo de secagem	6	0,022 <sup>ns</sup>
Resíduo	56	0,019

\*\*\*, \*\* e \* Significativo a nível de 0,1; 1 e 5% de probabilidade, pelo teste F. <sup>ns</sup> Não significativo.

Quando exposto à secagem, o tratamento-controle teve a taxa de sobrevivência de seus explantes drasticamente reduzida. Entretanto, não ocorreu diferença significativa no índice de sobrevivência, quando o tempo de secagem foi prorrogado para 10,1 horas (Figura 5). Quando os explantes foram pré-cultivados em solução 0,3 M de sacarose não ocorreu diferença significativa entre os diferentes tempos de secagem adotados no experimento. O pré-cultivo em solução 0,5 M de sacarose resultou maior índice de sobrevivência dos explantes, quando os mesmos foram expostos a 5,7 e 7,45 horas de secagem. Em pré-cultivo com 0,75 M de sacarose, os explantes apresentaram maior índice de sobrevivência no tempo zero e, quando expostos à secagem durante 5,7; 7,45 e 10,1 horas, o índice de sobrevivência foi reduzido bruscamente, mas não houve diferença significativa entre estes três diferentes tempos de secagem (Figura 5).



**Figura 5.** Efeito das diferentes concentrações de sacarose (0; 0,3; 0,5 e 0,75M) na aquisição de tolerância dos tecidos à secagem durante 0; 5,7; 7,45 e 10,1 horas, em função do índice médio de sobrevivência dos explantes. Para cada concentração de sacarose, as barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Quando não foi realizado o pré-cultivo, o índice de sobrevivência dos ápices caulinares encapsulados reduziu drasticamente com a diminuição do teor de umidade das cápsulas. Esta redução sugere que, quando a água foi removida da célula, ocorreu o “efeito soluto” que são mudanças no pH, aumento na concentração de eletrólitos, desnaturação das proteínas, fase de transição da membrana e interações macromoleculares (Lurswijidjarus e Thammasiri, 2004).

A sacarose atua como soluto compatível na proteção das macromoléculas e membranas durante a secagem, quando a água ainda está presente na massa citoplasmática, e como substituta da água quando a hidratação é perdida gradualmente. Neste último caso, interage com as proteínas e membranas através da ligação de hidrogênio impedindo, assim, a desnaturação das proteínas (Hoekstra et al., 2001b). O pré-cultivo dos ápices caulinares em meio contendo alta concentração de sacarose é comumente utilizado para induzir a tolerância à secagem (Shatnawi et al., 1999).

Os ápices caulinares encapsulados de cana-de-açúcar que foram pré-cultivados em meio contendo 0,3 M de sacarose forneceram os maiores índices de sobrevivência, independentemente do tempo de secagem (Figura 6). Este comportamento indica que a concentração 0,3M de sacarose foi eficiente na proteção da bicamada lipídica e das proteínas durante a secagem. E que esta é, provavelmente, a concentração de sacarose

necessária para a formação da camada de hidratação vítrea amorfa, responsável por impedir os rompimentos mecânicos e a desnaturação das proteínas. Porém, é importante destacar que a concentração ideal de sacarose varia entre as espécies e até mesmo entre variedades da mesma espécie. A concentração de sacarose ideal para morango (Adela e Deliu, 2006) e lúpulo (Martínez et al., 1999) foi de 0,75 M; 0,5 M para alfafa (Shibli et al., 2001); 0,3 M para orquídea (Lurswijidjarus e Thammasiri, 2004). Então, antes de se aplicar um protocolo de criopreservação é necessário avaliar qual a concentração ideal de sacarose para a espécie/variedade de interesse.

Quando pré-cultivados em solução 0,5 M de sacarose, os ápices caulinares apresentaram comportamento atípico. Neste tratamento, o maior índice de sobrevivência foi observado quando os explantes foram expostos à secagem durante 5,7 e 7,45 horas (Figura 5) e não no tempo zero, como era esperado.

O comportamento apresentado pelos explantes pré-cultivados em 0,3 e 0,5 M de sacarose, quando expostos à secagem, pode ser explicado pelo fato que o tratamento com estas concentrações de sacarose foi eficiente na indução da tolerância à secagem, para os ápices caulinares de cana-de-açúcar. A variedade RB72454 é resistente à seca (PMGCA, 2008); esta característica combinada com o pré-cultivo fez com que os explantes se recuperassem bem do estresse, gerado pela secagem. A tolerância natural da variedade RB72454 à seca pode ter oferecido alguma proteção à secagem.

A concentração mais elevada de sacarose (0,75M) resultou um baixo índice de sobrevivência dos explantes, após a secagem. Isto ocorreu devido a um possível aumento da concentração de sacarose nas cápsulas de alginato, o qual deve ter ultrapassado o ponto-limite, resultando o choque osmótico. É importante destacar que, durante o pré-cultivo, ocorre a dissociação da sacarose em glicose e frutose, o que foi demonstrado por Uragami et al. (1990) para gemas axilares de aspargo. Esta dissociação no interior da célula resultou considerável aumento da osmolaridade; 1 M de sacarose resultou 2M de monossacarídeos. Este aumento na osmolaridade, possivelmente, resultou no choque osmótico e, conseqüentemente os ápices não retomaram o crescimento e tornaram-se necrosados, sendo esta uma reação normal dos tecidos vivos ao estresse. O emprego do aumento progressivo na concentração de sacarose permitiu que os explantes de *Vitis vinifera* fossem expostos a concentrações elevadas de sacarose, que se mostraram inicialmente deletérias (Plessis et al., 1991). O aumento progressivo na concentração de sacarose, no meio de pré-cultivo, possibilita que ápices caulinares

superem sua sensibilidade à exposição direta a altas concentrações de sacarose (Wang et al., 2002).

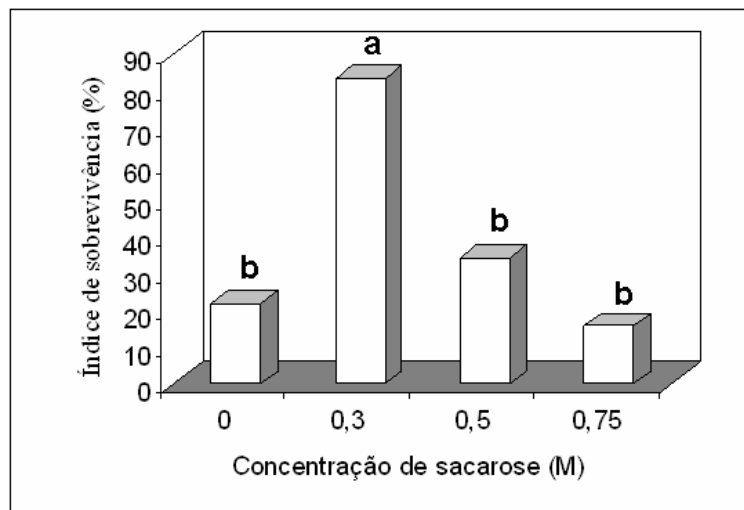
#### 3.4 – Influência das diferentes concentrações de sacarose no índice de sobrevivência dos explantes expostos à secagem durante 10,1 horas

Considerando que quanto menor o teor de água nas células maior é a probabilidade de se obter sucesso na criopreservação, procurou-se determinar o tratamento que resultasse em maior índice de sobrevivência dos explantes, quando exposto a 10,1 horas de secagem, o que corresponde a um teor de umidade de 10%, aproximadamente.

A concentração de sacarose 0,3 M resultou em maior índice de sobrevivência dos explantes, quando expostos a 10,1 horas de secagem. As demais concentrações não diferiram estatisticamente entre si (Figura 6).

Para obter sucesso na criopreservação, a formação de cristais de gelo dentro das células durante a imersão em nitrogênio líquido deve ser evitada. A redução do teor de água das células antes do congelamento é a metodologia empregada, para impedir a formação dos cristais de gelo, considerando-se que a água desempenha muitas funções biológicas fundamentais nas células de organismos vivos. Tratamentos que resultem um baixo teor de água nas células, mas não causem a morte celular, constituem um fator-chave para o sucesso da técnica (Shibli et al., 2001).

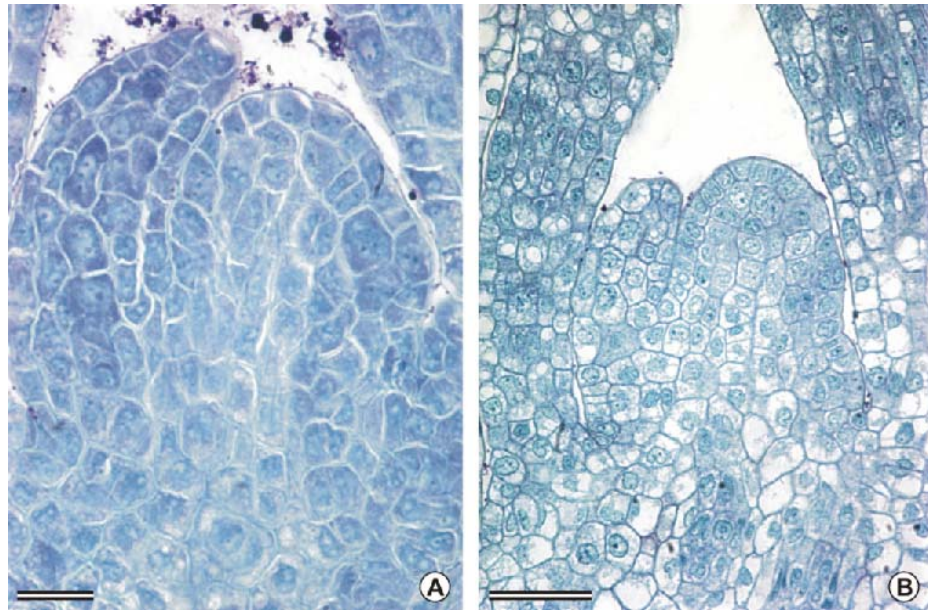
Açúcares são considerados importantes na aquisição de tolerância dos tecidos à secagem e ao congelamento, em várias espécies (Lenné et al., 2007). O efeito protetor dos açúcares ocorre pela formação de uma matriz vítrea e através da interação direta entre os lipídios e os açúcares (Koster et al., 2000; Crowe et al., 2001; Cacula e Hinch, 2006). Com a formação da matriz vítrea, os açúcares formam uma camada de hidratação vítrea amorfa, que impede os rompimentos mecânicos e a desnaturação das proteínas da membrana. A interação ajuda a estabilizar as membranas celulares, durante a desidratação e congelamento e a manter a integridade e função através da minimização dos danos na camada dupla de lipídios.



**Figura 6.** Efeito da concentração de sacarose na aquisição de tolerância à secagem durante 10,1 horas em câmara de fluxo laminar. Os resultados foram analisados pela média do índice de sobrevivência. As barras com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Lurswijidjarus e Thammastiri (2004) também obtiveram maior índice de sobrevivência após 10 horas de secagem ao ar, quando os ápices caulinares de orquídea encapsulados foram pré-cultivados em meio contendo 0,3 M de sacarose. Devido ao elevado acúmulo de açúcar nos explantes, os danos gerados pela secagem foram evitados e a sobrevivência aumentou. Isto foi informado para criopreservação de ápices caulinares de beterraba, usando-se o tratamento de aclimatação ao frio (Vandenbussche et al., 1999). Wang et al. (2002) sugerem que uma alta concentração de açúcar deve ser acumulada nas células dos explantes, quando estes são pré-cultivados em meio contendo alta concentração de sacarose, o que resulta na indução de tolerância à secagem.

As análises histológicas revelaram que, após a secagem, a estrutura da célula é modificada. O citoplasma se torna retraído, distanciando-se da parede celular da célula (Figura 7 A); entretanto, após três dias em meio de regeneração, as células dos ápices caulinares eram capazes de recuperar suas características iniciais (Figura 7 B). Isto indica que os ápices caulinares, quando pré-cultivados em MB contendo concentração adequada de sacarose, são capazes de se recuperar rapidamente dos danos provocados pela secagem.

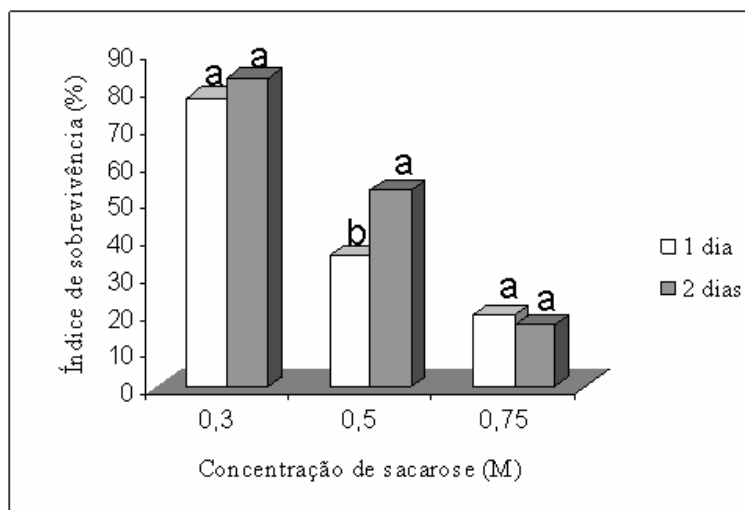


**Figura 7.** Seções longitudinais de ápices caulinares de cana-de-açúcar. A: pré-cultivo em solução 0,3 M durante um dia e secagem durante 10,1 horas. B: pré-cultivo durante um dia em solução 0,3 M de sacarose e secagem durante 10,1 horas após três dias em MB. Notar o citoplasma retraído em A. Barra = 25  $\mu\text{m}$  (A), 50  $\mu\text{m}$  (B).

Quando os explantes foram pré-cultivados em meio contendo 0,5 M ou 0,75 M de sacarose e desidratados por 10,1 horas, ocorreu uma redução drástica no índice de sobrevivência. Estas duas concentrações não diferiram estatisticamente entre si nem com o tratamento-controle. Os ápices caulinares foram sensíveis a estas concentrações mais elevadas de sacarose, quando expostos à secagem durante 10,1 horas o que causou, provavelmente, um choque osmótico nas células, resultando um baixo índice de sobrevivência dos explantes.

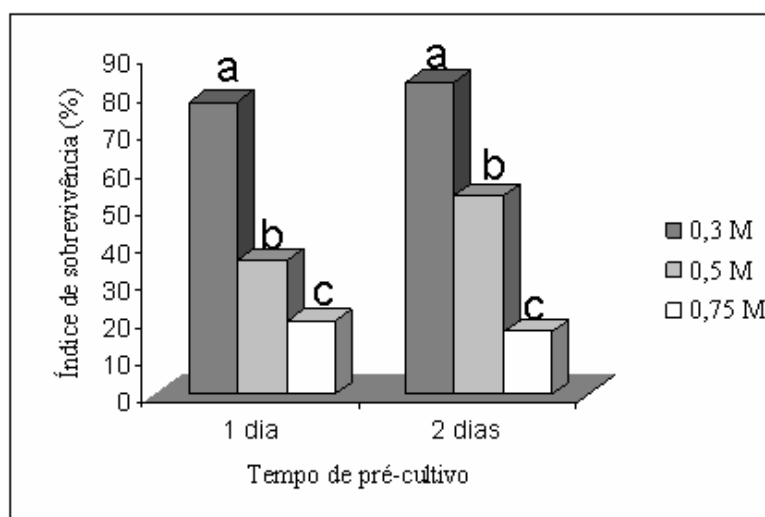
### 3.5 – Efeito do tempo de pré-cultivo no índice de sobrevivência dos explantes

Para verificar o efeito do tempo de pré-cultivo na sobrevivência dos ápices caulinares, foram avaliadas as concentrações de 0,3; 0,5 e 0,75 M de sacarose durante um e dois dias. Observou-se que não houve diferença significativa entre os dois períodos de pré-cultivo, quando foram empregadas as concentrações de 0,3 e 0,75 M de sacarose. Quando a concentração de 0,5 M foi adotada, um significativo aumento no índice de sobrevivência foi observado, após o pré-cultivo de dois dias (Figura 8).



**Figura 8.** Efeito das concentrações de sacarose (0,3; 0,5 e 0,75M), combinadas com o tempo de pré-cultivo (1 e 2 dias), no índice médio de sobrevivência dos explantes. Para cada concentração de sacarose, as barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Independentemente do tempo de pré-cultivo, as três concentrações de sacarose foram estatisticamente diferentes, sendo 0,3 M a concentração de sacarose que resultou em maior índice de sobrevivência dos explantes, seguida pela concentração de 0,5 M, enquanto o pior desempenho foi apresentado pela concentração de 0,75 M (Figura 10).



**Figura 9.** Efeito do tempo de pré-cultivo em solução de sacarose (0,3; 0,5 e 0,75M) no índice de sobrevivência médio dos explantes. Para o mesmo tempo de pré-cultivo, as barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

O pré-cultivo é utilizado para aumentar a tolerância dos ápices caulinares à desidratação e posterior congelamento em nitrogênio líquido (Wang et al., 2005). A concentração de 0,3 M, empregada na solução de pré-cultivo, resultou maior índice de sobrevivência. Esta concentração de sacarose não causou estresse osmótico nos ápices caulinares, bem como os protegeu eficientemente dos danos gerados pela secagem.

Wang et al. (2005) observaram que o índice de sobrevivência dos ápices caulinares encapsulados de framboesa foi afetado pela duração do tempo de pré-cultivo. Segundo os autores, quando a duração do pré-cultivo foi de um a três dias, a sobrevivência dos ápices caulinares se manteve relativamente constante, mas quando prorrogado, a taxa de sobrevivência diminuiu. Já Paulet et al. (1993) observaram que, quando o pré-cultivo foi prorrogado para sete dias, ocorreu apenas uma limitada indução de mortalidade dos ápices caulinares encapsulados de cana-de-açúcar.

Embora sendo a mais adequada para garantir altos índices de sobrevivência dos ápices caulinares criopreservados de várias espécies, como maçã (Paul et al., 2000), uva (Wang et al., 2000) e citrange (Wang et al., 2002), a concentração de sacarose de 0,75 M se mostrou deletéria para algumas espécies de plantas como eucalipto (Poissonnier et al., 1992) e trifoliata (Gonzalez-Arno et al., 1998).

Panis et al. (1996) associaram a taxa nula de sobrevivência, obtida quando as gemas de banana foram pré-cultivadas em meio enriquecido com 0,75 M de sacarose, ao choque osmótico gerado por esta concentração de sacarose nos explantes. Também no presente trabalho, os ápices caulinares de cana-de-açúcar se mostraram sensíveis à concentração de sacarose de 0,75 M. Isto indica que, embora a sacarose apresente um importante papel na aquisição de tolerância dos tecidos à secagem e ao congelamento em nitrogênio líquido e embora não seja um produto tóxico, diferentes tecidos de plantas distintas devem apresentar diferentes limites de tolerância à presença de sacarose dentro de suas células (Santos, 2004).

Independentemente da concentração de sacarose, tempo de pré-cultivo e secagem, a extração dos ápices caulinares das cápsulas de alginato não foi necessária, uma vez que os ápices caulinares em crescimento são capazes de romper a cápsula. O desenvolvimento dos ápices caulinares foi rápido e direto sem a formação de calo, enquanto o alongamento dos primórdios foliares foi iniciado três dias após serem colocados em meio de reestabelecimento. O cultivo no escuro imediatamente após a secagem, provavelmente, impediu os danos causados pelo efeito oxidativos da luz. O uso de antioxidantes no meio de cultura, como o ácido cítrico, o ácido ascórbico, o

nitrate de prata e a cisteína no MB, também deve ter resultado um efeito positivo pela inibição da produção dos compostos fenólicos, que são produzidos em grande quantidade pelos tecidos de cana-de-açúcar (Paulet et al., 1993).

#### **4 – CONCLUSÕES**

Nas condições de temperatura, tamanho e tempo de polimerização das cápsulas descritas, são necessárias 5,7; 7,45 e 10,1 horas de exposição dos ápices caulinares ao ar da câmara de fluxo laminar para a obtenção dos teores de umidade de 30, 20 e 10%, respectivamente.

O cultivo dos ápices caulinares em meio básico (MB) durante 12 horas confere, além da recuperação do estresse gerado pela sua extração, a reativação do metabolismo através do acúmulo de grãos de amido em suas células.

O pré-cultivo em meio de cultura enriquecido com sacarose induz um aumento na síntese de amido.

A concentração de sacarose 0,3 M resultou maior indução de tolerância dos explantes à secagem.

A concentração de sacarose 0,75 M foi deletéria para os explantes, resultando menores índices de sobrevivência.

Não houve diferença entre um e dois dias de pré-cultivo, quando foram utilizadas as concentrações de sacarose de 0,3 e 0,75M. Esta diferença somente ocorreu, quando a concentração de 0,5 M de sacarose foi adotada.

#### **5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADELA, H.; DELIU, C. Cryopreservation of strawberry shoot tips by encapsulation dehydration. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici**, 34: 28-33, 2006.

BAGNIOL, S.; ENGELMANN, F.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Histo-cytological study of apices from *in vitro* plantlets of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) during a cryopreservation process. **Cryo-Letters**, 13: 405-412, 1992.

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

BLOCK, W. Water status and thermal analysis of alginate beads used in cryopreservation of plant germplasm. **Cryobiology**, 47: 59-72, 2003.

BOGAART, G.V.D.; HERMANS, N.; KRASNIKOV, V.; VRIES, A.H. de; POOLMAN, B. On the decrease in lateral mobility of phospholipids by sugars. **Biophysical Journal**, 92: 1598-1605, 2007.

CACELA, C.; HINCHA, D. K. Low amounts of sucrose are sufficient to depress the phase transition temperature of dry phosphatidylcholine, but not for lyoprotection of liposomes. **Biophysical Journal**, 90: 2831–2842, 2006.

CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; OLIVER, A. E.; TSVETKOVA, N.; WOLKERS, W.; TABLIN, F. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. **Cryobiology**, 43: 89–105, 2001.

CROWE, L.M.; CROWE, J.H. Stabilisation of membranes in anhydrobiotic organisms. In: LEOPOLD, A.C. (ed.) **Membranes, metabolism, and dry organisms**. Comstock Publishing Associates, Cornell University, New York, USA, 188-209, 1986.

ENGELMANN, F. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (eds.) **Cryopreservation of tropical plant germplasm**. IPGRI, Tsukuba: Japan, 8-20, 1998.

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

GONZALEZ-ARNAO, M.T.; ENGELMANN, F.; URRRA, C.; MORENZA, M.; RIOS, A. Cryopreservation of citrus apices using the encapsulation–dehydration technique. **Cryoletters**, 19:177–182, 1998.

GOZALEZ-ARNAO, M.T.; ENGELMANN, F.; HUET, C.; URRRA, C. Cryopreservation of encapsulated apices of sugarcane: effect of freezing procedure and histology. **Cryo-Letters**, 74: 303-308, 1993.

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

HITMI A.; BARTHOMEUF, C.; SALLANON, H. Cryopreservation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* shoot tips. Effects of pretreatment conditions and retention of biosynthetic capacity. **Cryo-Letters**, 20: 109–120, 1999.

HOEKSTRA, F.; GOLOVINA, E.A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, 431-438. 2001 a.

HOEKSTRA, F.; GOLOVINA, E.A.; TETTEROO, F.A.A.; WOLKERS, W.F. Induction of desiccation tolerance in plant somatic embryos: how exclusive is the protective role of sugars? **Cryobiology**, 43: 140–150, 2001 b.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co.Inc, 1940.

KOSTER, K. L.; LEI, Y. P.; ANDERSON, M.; MARTIN, S.; BRYANT, G. Effects of vitrified sugars on phosphatidylcholine fluid-to-gel phase transitions. **Biophysical Journal**, 78:1932–1948, 2000.

LENNÉ, T.; BRYANT, G.; HOLCOMB, R.; KOSTER, K.L. How much solute is needed to inhibit the fluid to gel membrane phase transition at low hydration? **Biochimica et Biophysica Acta**, 1768: 1019–1022, 2007.

LURSWIJIDJARUS, W.; THAMMASIRI, K. Cryopreservation of shoot tips of *Dendrobium walteri* by encapsulation/dehydration. **Science Asia**, 30: 293-299, 2004.

MARI, S. ; ENGELMANN, F. ; CHABRILLANGE, N. ; HUET, C. ; MICHAUX-FERRIERE, N. Histo-cytological study of apices of coffee (*Coffea racemosa* and *C. sessiliflora*) *in vitro* plantlets during their technique cryopreservation using the encapsulation-dehydration. **Cryo-Letters**, 16: 289-298, 1995.

MARTINAZZO, A.P.; CORRÊA, P.C.; MELO, E.C.; BARBOSA, F.F. Difusividade efetiva em folhas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf submetidas à secagem com diferentes comprimentos de corte e temperaturas do ar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 9 (1): 68-72, 2007.

MARTÍNEZ, D.; TAMÉS, R.S; REVILLA, M.A. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot-tips of hop (*Humulus lupulus* L.) using encapsulation/dehydration. **Plant Cell Reports**, 19: 59-63, 1999.

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

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, 59:368-373, 1964.

PANIS, B.; TOTTE, N.; VAN NIMMEN, K.; WITHER, S.B., L.A.; SWENNEN, R. Cryopreservation of banana (*Musa* spp. ) meristem cultures after preculture on sucrose. **Plant Science**, 121: 95- 106, 1996.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In: INTERNACIONAL WORKSHOP ON “THE ROLE OF BIOTECHNOLOGY FOR THE CHARACTERISATION AND CONSERVATION OF CROP, FORESTRY, ANIMAL AND FISHERY GENETIC RESOURCES”. Turin, Italy, 43-54, 2005.

PAUL, H.; DAIGNY, G.; SANGWAN-NORREEL, B.S. Cryopreservation of apple (*Malus×domestica* Borkh.) shoot tips following encapsulation–dehydration or encapsulation–vitrification. **Plant Cell Reports**, 19:768–774, 2000.

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**, 12: 525-529, 1993.

PLESSIS P.; LEDDET, C.; DEREUDDRE, J. Resistance to dehydration and to freezing in liquid nitrogen of alginate coated shoot tips of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay). **C. R. Acad. Sci. Paris**. Serie III. 313: 373–380, 1991.

PMGCA. PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO DA CANA-DE-AÇÚCAR. Disponível em: <<http://www.agrodon.com.br/LINKRB72454.HTML>>. Acesso em: 07 set. 2008.

POISSONNIER, M.; MONOD, V.; PAQUES, M.; DEREUDDRE, J. Cryopreservation in liquid nitrogen of *Eucalytus gunnii* shoot tips grown in vitro following encapsulation and dehydration. **Annales de Recherches Sylvicoles**, AFOCEL, 5–23, 1992.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>, 2007.

REED, B.M.; SCHUMACHER, L.; WANG, N.; D'ACHINO, J.; BARKER, R.E. Cryopreservation of bermudagrass germplasm by encapsulation dehydration. **Crop Science**, 46: 6-11, 2005 a.

REED, B.M.; SCHUMACHER, L.; DUMET, D.; BENSON, E.E. Evaluation of a modified encapsulation–dehydration procedure incorporating sucrose pretreatments for the cryopreservation of ribes germplasm. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 41: 431-436, 2005 b.

SAKAI, A. Development of cryopreservation techniques. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (eds.) **Cryopreservation of tropical plant germplasm**. IPGRI, Tsukuba: Japan, 1-7, 1998.

SANTOS, I. R. I. **Criopreservação de eixos embrionários de espécies de *Citrus* usando encapsulamento e desidratação**. Série Embrapa - Boletim de Pesquisa. Brasília: Embrapa, 2004.

SHIBLI, R.A.; HAAGENSON, D.M.; CUNNINGHAM, S.M.; BERG, W.K.; VOLENEC, J.J. Cryopreservation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cells by encapsulation-dehydration. **Plant Cell Reports**, 20: 445–450, 2001.

SHATNAWI, M.A.; ENGELMANN, F.; FRATTARELLI, A.; DAMIANO, C. Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of almond (*Prunus dulcis* MILL.). **Cryo-Letters**, 20: 13-20, 1999.

SUZUKI, M.; ISHIKAWA, M.; AKIHAMA, T. A novel preculture method for the induction of desiccation tolerance in gentian axillary buds for cryopreservation. **Plant Science**, 135: 69–76, 1998.

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

VANDENBUSSCHE, B.; LEURIDAN, S.; VERDOODT, V.; GYSEMBERG, M.; DE PROFT, M. Changes in sugar content and fatty acid composition of in vitro sugar beet shoots after cold acclimation: influence on survival after cryopreservation. **Plant Growth Regulation**, 28:157–163, 1999.

VERLEYSSEN, H.; BOCKSTAELE, E.V.; DEBERGH, P. An encapsulation–dehydration protocol for cryopreservation of the azalea cultivar ‘Nordlicht’ (*Rhododendron simsii* Planch.). **Scientia Horticulturae**, 106: 402–414, 2005.

WANG, Q.C.; TANNE, E.; ARAV, A.; GAFNY, R. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of grapevine by encapsulation–dehydration. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, 63:41–46, 2000.

WANG, Q.C.; BATUMAN, O.; LI, P.; BAR-JOSEPH, M.; GAFNY, R. A simple and efficient cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of ‘Troyer’ citrange [*Poncirus trifoliata* Raf.×*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.] by encapsulation–vitrification. **Euphytica**, 128: 135–142, 2002.

WANG, Q.; LAAMANEN, J.; UOSUKAINEN, M.; VALKONEN, J.P.T. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation–vitrification and encapsulation–dehydration. **Plant Cell Reports**, 24: 280–288, 2005.

WITHERS, L.A.; ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of plant genetic resources. In: ALTMAN, A. (ed.) **Agricultural Biotechnology**. New York, Marcel Dekker, 57-88, 1998.

ZHAO, Y.; WU, Y.; ENGELMANN, F.; ZHOU, M.; ZHANG, D.; CHEN, S. Cryopreservation of apple shoot tips by encapsulationdehydration: effect of preculture, dehydration and freezing procedure on shoot regeneration. **Cryo-Letters**, 20: 103–108, 1999.

## CAPÍTULO 2

### EFEITO DE TRÊS MÉTODOS DE DESCONGELAMENTO EM ÁPICES CAULINARES ENCAPSULADOS CRIOPRESERVADOS DA VARIEDADE DE CANA-DE-AÇÚCAR RB72454

#### 1– INTRODUÇÃO

Embora a etapa crítica da criopreservação seja a secagem, devido às funções biológicas essenciais que a água desempenha nas células, o descongelamento tem um papel crucial em seu sucesso devido à probabilidade de ocorrer a formação de cristais de gelo, que causam injúrias nas células, tais como a ruptura das membranas, perda da semipermeabilidade e compartimentalização celular. Supõe-se que essas injúrias sejam resultantes do processo de desvitrificação do conteúdo citosólico, o que leva à formação e ao crescimento de cristais de gelo no interior das células. A formação desses cristais de gelo prejudiciais ocorre das seguintes maneiras: i) pelo congelamento da água liberada pelo processo de desvitrificação do conteúdo citosólico. Com o aumento da temperatura, a água que estava vitrificada sofre a desvitrificação, ocorrendo a liberação de água na forma líquida, que pode congelar antes que a temperatura ambiente seja atingida; ii) pelo crescimento dos cristais de gelo diminutos, que se formaram durante o congelamento. Com o aumento da temperatura, esses pequenos cristais podem crescer, causando o rompimento e morte das células (Mazur, 1984).

A técnica do encapsulamento-desidratação, proposta por Fabre e Dereuddre (1990), baseia-se na tecnologia desenvolvida para produção de semente sintética. A técnica consiste no encapsulamento do explantes em gel de alginato de sódio, possibilitando que os explantes sejam eficientemente protegidos durante a desidratação (Verleysen et al., 2005). A técnica facilita a manipulação dos explantes *in vitro*, além de combinar dois procedimentos crioprotetores, que são o pré-cultivo com sacarose e a secagem ao ar em câmara de fluxo laminar (Martínez et al., 1999). Após o pré-cultivo e secagem, os explantes encapsulados podem ser, diretamente, imersos em nitrogênio líquido e descongelados à temperatura ambiente durante um período de tempo, que pode variar de 10 a 30 minutos.

O descongelamento é normalmente realizado em banho-maria a 38-40°C, durante 2 a 3 minutos, ou a 95°C durante 30 segundos, ou à temperatura ambiente dentro ou fora dos criotubos. Dumet et al. (2002) descongelaram os meristemas

encapsulados de *Perlargonium*, através da imersão direta das cápsulas congeladas em meio MS líquido enriquecido com 0,75M de sacarose a 20°C durante 1 minuto. Os autores obtiveram um significativo aumento no índice de sobrevivência, em comparação com o descongelamento em banho-maria a 40 e 90°C ou à temperatura ambiente. O sucesso foi atribuído a uma reduzida taxa de descongelamento e ao eventual efeito osmoprotetor do processo.

Considerando a importância do método de descongelamento, o objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto da combinação das diferentes concentrações de sacarose, do tempo de pré-cultivo e de secagem com os três diferentes métodos de descongelamento: a temperatura ambiente, em banho-maria e em meio MS líquido enriquecido com 0,75M de sacarose à temperatura ambiente, no índice de sobrevivência dos ápices caulinares de cana-de-açúcar encapsulados criopreservados.

## **2- MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos e Células Vegetais do setor de Fruticultura, Departamento de Fitotecnia e no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

### **2.1 – Estabelecimento *in vitro***

Para o estabelecimento *in vitro* foram utilizadas ponteiros de aproximadamente 60 cm de comprimento, coletadas de plantas adultas da variedade RB72454.

Após a coleta, as folhas mais externas das ponteiros foram eliminadas uma a uma até à visualização do último nó. As ponteiros foram reduzidas à região do ápice caulinar (explante), com aproximadamente 7,0 cm de comprimento por 0,8 cm de diâmetro. Os explantes extraídos foram mantidos mergulhados em água deionizada, para evitar a desidratação. Posteriormente, os explantes foram lavados em água com detergente na concentração 1:1 durante 10 minutos, sendo então pré-desinfestados da seguinte forma: 10 minutos em Cercobin 700 2,5% (p/v); 20 minutos em água sanitária comercial (2,0 a 2,5% de cloro ativo) (p/v) diluído em água deionizada em uma concentração de 1:1. Entre a primeira e a segunda desinfestação, os explantes foram enxaguados em água corrente e, após a terceira desinfestação, três vezes em água

destilada autoclavada. Logo após a pré-desinfestação, foram extraídos dois pares de folhas de cada explante.

Os explantes foram levados para câmara de fluxo laminar e desinfestados em álcool 70% (v/v) durante 1 minuto, em bicloreto de mercúrio 0,01% (p/v) durante 20 minutos, e em água sanitária comercial (2,0 a 2,5% de cloro ativo) (p/v) durante 20 minutos. Entre cada etapa, os explantes foram enxaguados três vezes com água destilada autoclavada. Em seguida, com o auxílio de pinça e bisturi esterilizados, foram retiradas todas as partes escurecidas dos tecidos. Os explantes foram reduzidos a 3,0 cm de comprimento por 0,4 cm de diâmetro e foram inoculados, individualmente, em tubos de ensaios de dimensão 25 x 150 mm com tampa de polipropileno, contendo 10 ml de meio básico (MB).

O MB foi constituído por sais, nutrientes orgânicos e vitaminas de Murashige & Skoog (MS, 1962) e acrescido de 30 g/L de sacarose, 100 mg/L de mio-inositol, 100 mg/L de ácido cítrico, 40 mg/L de cisteína, 15 mg/L de ácido ascórbico, 2,0 mg/L de nitrato de prata, solidificado com 7,0 g/L de ágar (Ágar-Ágar Merck purificado e livre de inibidores para microbiologia), 1,16  $\mu\text{M}$  de cinetina e 2,22  $\mu\text{M}$  de 6-benzilaminopurina (BAP). O pH do meio foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  antes da adição do ágar e, posteriormente, autoclavado a  $121^\circ\text{C}$  e 1,5 atm durante 20 minutos. Os explantes foram incubados em sala com temperatura controlada a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e irradiância de  $\pm 52 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram, luz do dia, 40 W).

Após a emissão dos primeiros perfilhos ( $\pm 4$  perfilhos), estes foram repicados e transferidos para frascos de 350 ml (1 perfilho/frasco) com tampas polipropileno, contendo 30 ml do MB. As plantas foram incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente e repicadas a cada 25 dias até a obtenção do material necessário para a realização dos experimentos, que consistiu de ápices caulinares com 3 a 4 primórdios foliares e uma parte basal.

## 2.2 – Criopreservação

### 2.2.1 – Encapsulamento

Os ápices caulinares, utilizados nos experimentos, mediam entre 3 e 4 mm e foram extraídos com auxílio de pinça e bisturi a olho nu de brotos, que mediam de 8 a

10 cm, aos 15 dias após sua última repicagem. Após a extração os ápices caulinares foram mantidos em placa de Petri de vidro estéril, contendo papel toalha umedecido com água deionizada para evitar sua desidratação até que fossem extraídos todos os ápices necessários. Então, os mesmos foram transferidos para o MB sem a presença dos reguladores de crescimento, onde permaneciam durante 12 horas para recuperação do estresse gerado pela extração.

Após este período, os ápices foram transferidos para MB, sem cálcio e reguladores de crescimento, contendo 3% (p/v) de ácido algínico sal sódico (Sigma) de baixa viscosidade. Com a utilização de uma micropipeta de 5.000 µl com ponteira estéril, os ápices foram capturados com 500 µl do meio de cultura e colocados para polimerizar durante 10 minutos em uma solução de 100 mM de nitrato de cálcio. Cada cápsula (7-8 mm) continha um ápice caulinar.

### 2.2.2 – Pré-cultivo e secagem

Após a polimerização, os ápices caulinares encapsulados foram transferidos para frascos, contendo MB líquido enriquecido com 0,3 e 0,75 M de sacarose por um dia e com 0,5 M de sacarose por dois dias, a fim de induzir a tolerância dos ápices caulinares à secagem. Os frascos contendo as cápsulas (30 cápsulas/frasco) com 30ml dos diferentes meios de pré-cultivo foram mantidos sob agitação (80 rpm) em agitador orbital, em sala com temperatura controlada a  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Antes da secagem, as cápsulas foram secas superficialmente em papel toalha estéril e transferidas para placas de Petri de vidro (90 x 18 mm), que foram mantidas semi-abertas para secagem durante 0; 5,7; 7,45 e 10,1 horas de exposição à câmara de fluxo laminar. Estes períodos correspondem ao tempo necessário de exposição em câmara de fluxo laminar, para a obtenção dos teores de umidade 30, 20 e 10% (vide Capítulo 1).

### 2.2.3 – Congelamento e descongelamento

Na criopreservação dos ápices caulinares encapsulados, estudou-se o efeito da concentração de sacarose, do tempo de secagem e do método de descongelamento em um fatorial 3X4X3 (concentração de sacarose, tempo de secagem e método de descongelamento), totalizando 36 tratamentos (Tabela 1).

Após os diferentes períodos de secagem, as cápsulas foram transferidas para os criotubos (10 cápsulas por tubo) que, em seguida, foram imersos em nitrogênio líquido, onde permaneceram durante 10 minutos. Ao ser retirado do nitrogênio líquido, o material foi submetido a três métodos de descongelado: a temperatura ambiente durante 20 minutos; em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) enriquecido com 0,75M de sacarose durante dois minutos; e em banho-maria a 40°C durante 3 minutos. Cada método de descongelamento foi composto por três repetições (três criotubos). Após a realização de cada um dos métodos de descongelamento, as cápsulas foram transferidas para frascos contendo o MB. Os frascos foram mantidos no escuro durante sete dias e depois transferidos para o claro, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram, luz do dia, 40 W). O teste de viabilidade foi feito uma vez por semana, sendo a última leitura realizada dois meses após o reestabelecimento dos explantes em MB. Os ápices caulinares foram considerados vivos, quando houve alongamento dos primórdios foliares.

### 2.3 – Análise Histológica

Para as análises histológicas, três ápices caulinares foram coletados, após serem pré-cultivados durante um e dois dias em MB enriquecido com 0,3; 0,5 e 0,75 M de sacarose, desidratados ao ar em câmara de fluxo laminar durante 0; 5,7; 7,45 e 10,1 horas, congelados rapidamente em nitrogênio líquido (-196°C) e descongelados ao ar da câmara de fluxo laminar durante 20 minutos e em solução de 0,75 M de sacarose durante dois minutos; após 0 e 7 dias em meio de reestabelecimento. Os ápices caulinares foram removidos das cápsulas, antes de serem processados para microscopia. As amostras foram fixadas em FAA<sub>50</sub> durante 48 horas à temperatura ambiente e estocadas em etanol 70% (Jonhansen, 1940). O material foi desidratado em série etílica crescente e incluído em metacrilato (Historesin-Leica), de acordo com as recomendações do fabricante. O material emblocado foi seccionado transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo com 4  $\mu\text{m}$  de espessura, corado com azul de toluidina (O' Brien et al., 1964) para metacromasia, e com lugol (Johansen, 1940) diluído (1:5) para detecção de amido, e montado sob lamínula com resina sintética (Permount). O laminário foi analisado em microscopia de luz, e as imagens digitalizadas, obtidas por meio de um fotomicroscópio (Olympus AX70) com sistema U-photo, câmera e microcomputador com o software Spot-Basic.

**Tabela 1.** Combinação da concentração de sacarose X tempo de pré-cultivo X tempo de secagem X método de descongelamento, utilizada na criopreservação de ápices caulinares de cana-de-açúcar encapsulados

Tratamentos	Concentração de sacarose (M)	Tempo de pré-cultivo (dias)	Tempo de secagem (h)	Método de descongelamento
T <sub>0</sub>	-	-	0	sacarose
T <sub>1</sub>	-	-	5,7	sacarose
T <sub>2</sub>	-	-	7,45	sacarose
T <sub>3</sub>	-	-	10,1	sacarose
T <sub>4</sub>	-	-	0	ar
T <sub>5</sub>	-	-	5,7	ar
T <sub>6</sub>	-	-	7,45	ar
T <sub>7</sub>	-	-	10,1	ar
T <sub>8</sub>	0,3	1	0	sacarose
T <sub>9</sub>	0,3	1	5,7	sacarose
T <sub>10</sub>	0,3	1	7,45	sacarose
T <sub>11</sub>	0,3	1	10,1	sacarose
T <sub>12</sub>	0,3	1	0	ar
T <sub>13</sub>	0,3	1	5,7	ar
T <sub>14</sub>	0,3	1	7,45	ar
T <sub>15</sub>	0,3	1	10,1	ar
T <sub>16</sub>	0,3	1	0	banho maria
T <sub>17</sub>	0,3	1	5,7	banho maria
T <sub>18</sub>	0,3	1	7,45	banho maria
T <sub>19</sub>	0,3	1	10,1	banho maria
T <sub>20</sub>	0,5	2	0	sacarose
T <sub>21</sub>	0,5	2	5,7	sacarose
T <sub>22</sub>	0,5	2	7,45	sacarose
T <sub>23</sub>	0,5	2	10,1	sacarose
T <sub>24</sub>	0,5	2	0	ar
T <sub>25</sub>	0,5	2	5,7	ar
T <sub>26</sub>	0,5	2	7,45	ar
T <sub>27</sub>	0,5	2	10,1	ar
T <sub>28</sub>	0,75	1	0	sacarose
T <sub>29</sub>	0,75	1	5,7	sacarose
T <sub>30</sub>	0,75	1	7,45	sacarose
T <sub>31</sub>	0,75	1	10,1	sacarose
T <sub>32</sub>	0,75	1	0	ar
T <sub>33</sub>	0,75	1	5,7	ar
T <sub>34</sub>	0,75	1	7,45	ar
T <sub>35</sub>	0,75	1	10,1	ar

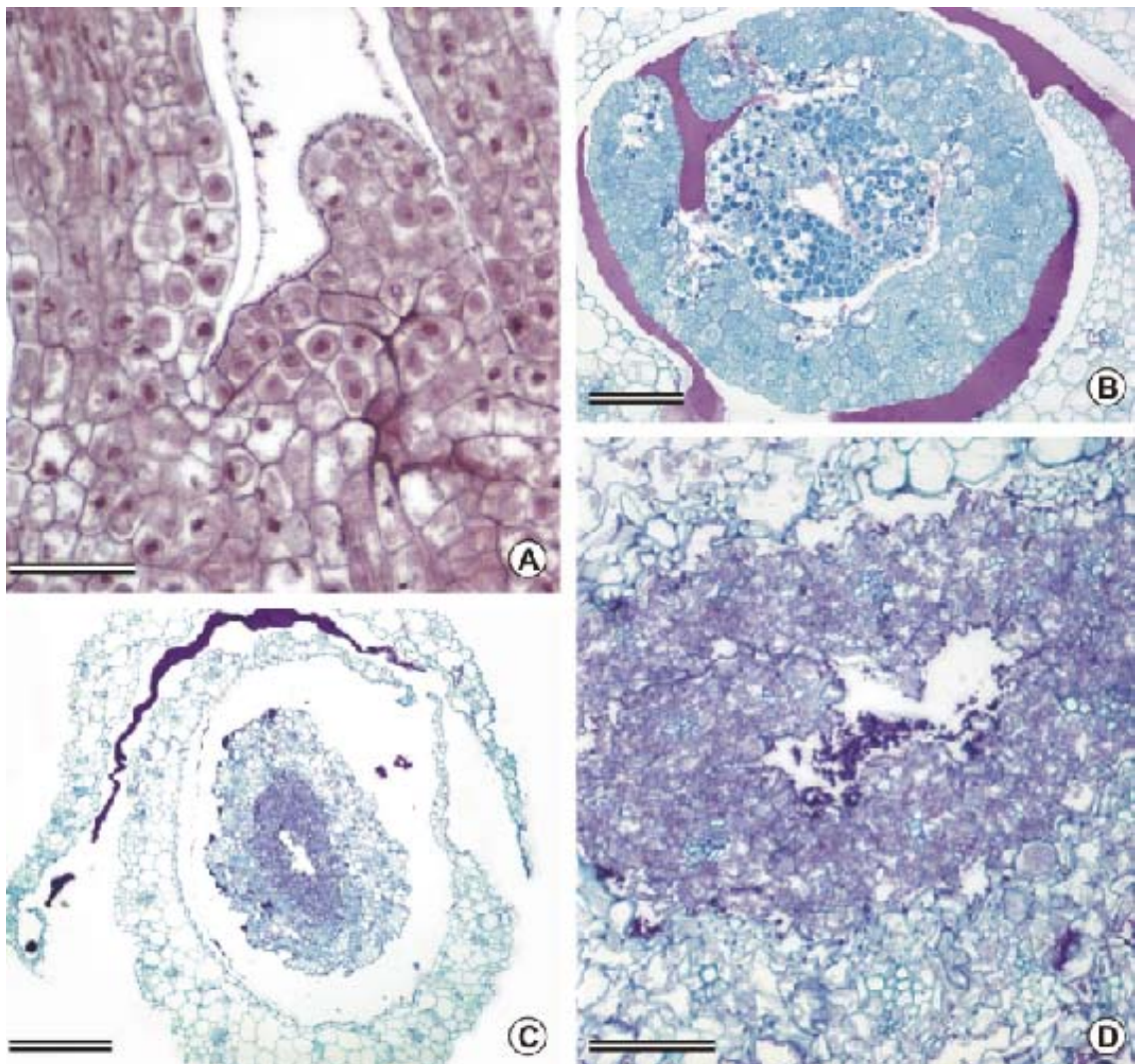
### 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Independentemente da combinação adotada de concentração de sacarose X tempo de pré-cultivo X tempo de secagem X método de descongelamento, a taxa de sobrevivência obtida, quando os explantes foram criopreservados, foi nula. As análises histológicas revelaram que as células dos ápices caulinares criopreservados foram severamente danificadas, o citoplasma ficou completamente retraído e concentrado na região central da célula, distanciando-se da parede celular, os núcleos tornaram-se intensamente e uniformemente corados e nenhum nucléolo era evidente (Figura 1 A). As células da região basal também foram, severamente, danificadas após a criopreservação. As células dos ápices caulinares criopreservados não recuperaram suas características iniciais, após sete dias em meio de regeneração. No corte transversal, observou-se que as células ganharam um aspecto desidratado (Figuras 1 C e 1 D), perdendo a conformação inicial (Figura 1 B) e adquiriram conformação sinuosa.

Golmirzaie et al. (2000), utilizando a microscopia eletrônica de transmissão no estudo de genótipos de batata criopreservados, observaram que os danos relacionados ao aspecto do citoplasma e à plasmólise celular pareceram ser os que mais afetaram a taxa de sobrevivência. Esses autores observaram que os genótipos de batata, que apresentaram maior percentual desses sintomas, tiveram a menor taxa de sobrevivência. A ruptura da parede celular foi outro dano que as células sofreram, quando expostas ao congelamento. Com o rompimento da parede celular, ocorre o vazamento de eletrólitos e, conseqüentemente, a perda de líquidos. Isto explicaria o aspecto desidratado que as células da cana-de-açúcar adquiriram, após o congelamento.

Segundo Wesley-Smith et al. (1995), uma conseqüência mais provável do protocolo de congelamento é a ocorrência generalizada de eventos de nucleação ao longo de todo o tecido, como a conseqüência da formação dos cristais de gelo, que apresentam tamanho reduzido devido à taxa de descongelamento. Esta observação foi baseada pela ausência de dano visível nas organelas ou no citoplasma, independente do grau de hidratação. No entanto, esses autores observaram danos à membrana plasmática e nas paredes celulares, quando os ápices embrionários de ervilha, totalmente hidratados, foram congelados rapidamente, baseando-se no pressuposto de que o supercongelamento e a nucleação intracelular ocorrem, quando o congelamento rápido é usado. De acordo com os autores, é possível que a cristalização se inicie no ambiente

extracelular antes do meio intracelular. Se isto for válido, o cristal pode crescer suficientemente para induzir danos à parede celular e à membrana plasmática, antes mesmo de qualquer dano intracelular.



**Figura 1.** Seções longitudinal e transversal de ápices caulinares de cana-de-açúcar. A: ápice pré-cultivado durante um dia em MB enriquecido com 0,5 M de sacarose, não exposto a secagem, congelado, descongelado em solução de sacarose 0,75 M, após 7 dias em MB. B: ápice pré-cultivado durante um dia em MB enriquecido com 0,3 M de sacarose, não exposto à secagem, após 3 dias em MB. C-D: ápice pré-cultivado durante um dia em MB enriquecido com 0,5 M de sacarose, exposta à secagem durante 7,45 horas, congelado, descongelado a temperatura ambiente durante 20 minutos, após 7 dias em MB. Notar a retração do citoplasma em A e o aspecto desidratado das células em C e D. Barra = 50  $\mu$ m (A, D), 100  $\mu$ m (B), 200  $\mu$ m (C).

Embora tenha aumentado a tolerância dos tecidos à secagem, o pré-cultivo não foi suficiente para induzir a tolerância ao congelamento, mesmo quando combinada com os diferentes tempos de secagem. Os benefícios da sacarose são bem conhecidos, pois, além do efeito osmótico, ela é capaz de penetrar em grandes quantidades nas células, durante o pré-cultivo. O acúmulo de açúcar nos tecidos está associado à tolerância ao congelamento, mas não é uma garantia de viabilidade dos tecidos após a criopreservação (Adela e Deliu, 2006). Apesar de um elevado nível de tolerância à desidratação e posterior congelamento possa ser induzida por um tratamento de pré-cultivo em um meio contendo elevada concentração de sacarose, há muitos casos em que este tratamento apenas não é suficiente, tornando-se necessário um tratamento de aclimatização ao frio, anterior ao pré-cultivo (Niino e Sakai, 1992; Niino et al., 1997). A aclimatização ao frio é um método comumente utilizado sua utilização resulta mudanças endógenas nos tecidos da planta, o que contribui para aumentar a tolerância destes ao congelamento (Stushnoff et al. 1998).

Uma possível explicação para a taxa nula no índice de sobrevivência pode ser o fato de a combinação concentração de sacarose X tempo de pré-cultivo X tempo de secagem não ter sido suficiente para induzir a vitrificação do citoplasma. Em consequência da não vitrificação do citoplasma, provavelmente ocorreu à formação de cristais de gelo no meio intracelular. A formação dos cristais de gelo durante o congelamento é um processo complexo, que compreende uma série de etapas complexas, ou seja, nucleação, crescimento dos cristais e, ou recristalização, que são considerados os elementos principais que afetam a sobrevivência das células submetidas à criopreservação (Gonzalez-Arno et al., 2008). Estes cristais de gelo, geralmente, produzem lesões físicas e de natureza bioquímica nas células, o que pode resultar na perda da viabilidade após o descongelamento (Gonzalez-Arno et al., 2008).

A taxa nula de sobrevivência também pode ser resultado da distribuição desigual de água nos tecidos. Changrum et al. (1999) sugerem que a taxa de perda de água entre os diferentes tecidos de várias espécies e mesmo entre o mesmo tecido é variável. Assim, a secagem pode não ser necessariamente benéfica para a criopreservação, se a distribuição de água resultar diferentes respostas ao congelamento entre as células do mesmo tecido (Dumet e Benson, 2000). As células com elevado teor água têm predisposição à formação de cristais de gelo intracelular, sendo que a alteração

volumétrica diferencial nas células levaria aos consideráveis estresses físicos no tecido (Dumet e Benson, 2000; Reinhoud et al., 2000).

O sucesso da criopreservação não é apenas determinado pela técnica da criopreservação em si, mas também pela condição do ápice caulinar (idade de crescimento). Portanto, para o sucesso da criopreservação, os ápices extraídos devem estar em um estado fisiológico adequado para aquisição da osmotolerância à secagem e ao congelamento (Sakai, 1998). Bouafia et al. (1996) obtiveram elevada taxa de sobrevivência, após a secagem e o subsequente congelamento em nitrogênio líquido, quando usaram ápices caulinares axilares de batata. Os ápices caulinares axilares, extraídos durante o desenvolvimento do caule, tiveram suas taxas de sobrevivência reduzidas transitoriamente, mas aumentadas gradualmente com o passar dos dias. Um fenômeno semelhante foi observado para cravo (Dereuddre et al., 1988). Portanto, para o sucesso da técnica, deve-se considerar a importância do estado fisiológico ou morfológico do material vegetal na aquisição de tolerância ao congelamento dos órgãos da planta.

No presente trabalho, os explantes foram obtidos de plantas estabelecidas há mais de 18 meses *in vitro*. Harding et al. (1991) compararam o efeito do curto (6-8 semanas) e longo (três anos) período de cultivo *in vitro* no total de sobrevivência dos ápices caulinares de batata criopreservados. Esses autores observaram que o longo período de cultivo *in vitro* reduziu a habilidade dos ápices caulinares para sobreviverem ao congelamento. Os autores sugeriram que, após um longo período de cultivo, é provável que a planta sofra distúrbios na regulação de hormônios, no metabolismo e na assimilação de nutrientes. Estas alterações no estado fisiológico ocorrem gradualmente, afetam o vigor e alteram a capacidade das plantas para sobreviverem a condições de estresse como o da criopreservação. Assim, como observado em batata por Harding et al. (1991), o longo tempo de cultivo *in vitro* pode ter influenciado a habilidade dos ápices caulinares de cana-de-açúcar em sobreviverem ao congelamento.

González-Arno et al. (2000) também não obtiveram sucesso com a técnica encapsulamento-desidratação na criopreservação de ápices de abacaxi (*Ananas comosus*). Esses autores correlacionaram o resultado negativo com a alta sensibilidade dos ápices à sacarose e à secagem. A perda da viabilidade após o congelamento foi associada à cristalização da água congelável, que não foi eliminada pela secagem, no meio intracelular. Os autores sugerem que este efeito negativo poderia ser evitado, utilizando-se o congelamento lento dos ápices encapsulados, o que permitiria a

desidratação induzida pelo congelamento. O estresse nas células, causado pelo ciclo congelamento/descongelamento, deve resultar na formação de radicais livres. Estes compostos podem causar mais danos como, por exemplo, a peroxidação dos lipídeos, desnaturação de proteínas e mutação no DNA (Reinhold et al., 2000).

A literatura cita que o explante mais adequado ao uso em criopreservação consiste do meristema apical com um primórdio foliar, medindo de 0,5 a 2 mm de comprimento, dependendo da espécie; e que o tamanho ideal combinado com a fase de desenvolvimento do explante é um dos fatores essenciais para obtenção de alta taxa de sobrevivência após o descongelamento (Takagi, 2000). Escobar et al. (1997) relataram que a viabilidade dos ápices de mandioca aumentou, significativamente quando pequenos ápices caulinares (1-2 mm em comprimento) foram usados como explante na criopreservação pelo método da secagem, em comparação com os ápices caulinares de maior tamanho (3-4 mm em comprimento).

González-Arno et al. (2000) obtiveram sucesso na criopreservação, quando utilizaram a técnica da vitrificação, mas tiveram que prorrogar o tempo de exposição ao tratamento com PVS<sub>2</sub> (Solução de Vitrificação de Planta n° 2), que normalmente é de 1 a 1,5 horas, para 7 horas. Essa prorrogação foi necessária, para obtenção de um índice ótimo de sobrevivência dos explantes após o congelamento. Os explantes utilizados no trabalho tinham uma estrutura compacta e cerca de 3 mm de comprimento, o meristema apical era coberto por 2 ou 3 primórdios foliares, que tinham uma cutícula muito espessa. Estas características do explante exigiram uma prorrogação na duração do tratamento para que a solução de vitrificação desidratasse eficientemente o explante.

Devido à disposição das folhas da cana-de-açúcar ser alternada e oposta (Blackburn, 1984), os primórdios foliares externos impedem a perda de água dos tecidos mais internos. Devido ao fato de o meristema estar muito bem envolvido pelos primórdios foliares, pode ter havido comprometimento da absorção de sacarose por suas células. Assim, a distribuição desigual de água nos tecidos e a dificuldade de absorção de sacarose, que é importante para induzir a tolerância ao congelamento, quando ocorreu o congelamento pode ter havido a formação dos cristais de gelo intracelularmente, o que teria causado a destruição das células. O ideal seria reduzir o número de primórdios foliares para um ou dois, reduzir o tamanho do explante para 1-2 mm de comprimento ou, então, adotar o mesmo tamanho do explante e aumentar o período de pré-cultivo para 5-7 dias.

### 3 – CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a combinação dos diferentes tratamentos, envolvendo concentração de sacarose, dias de pré-cultivo, tempo de secagem e método de descongelamento, não foi eficiente para a obtenção de sucesso na criopreservação de ápices caulinares de cana-de-açúcar.

O congelamento dos ápices caulinares resultou em danos irreversíveis às células, que foram completamente destruídas. Em consequência, os ápices caulinares não retomaram seu desenvolvimento após serem criopreservados.

### 4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELA, H.; DELIU, C. Cryopreservation of strawberry shoot tips by encapsulation-dehydration. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici**, 34: 28-33, 2006.
- BLACKBURN, F. **Sugar-cane**. Longman, New York, 414p., 1984.
- BOUAFIA, S.; JELTI, N.; LAIRY, G. ; BLANC, A. ; BONNEL, E. ; DEREUDDRE, J. Cryopreservation of potato shoot tips by encapsulation-dehydration. **Potato Research**, 39: 69-78, 1996.
- CHANGRUM, L.; LOH, C.S.; SUN, W.Q. An improved dehydration protocol for cryopreservation of *Brassica napus* somatic embryos. **Cryo-Letters**, 20: 263-8, 1999.
- DEREUDDRE, J.; FABRE, J.; BASSAGLIA, C. Resistance to freezing in liquid nitrogen of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. var. Eolo) axillary shoot tips excised from different aged in vitro plantlets. **Plant Cell Reports**, 7: 170-173, 1988.
- 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: ENGELMANN F.; TAKAGI, H. (eds.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm current research progress and application**. JIRCAS/IPGRI, 43-56, 2000.
- DUMET, D.; GRAPIN, A.; BAILLY, C.; DORION, N. Revisiting crucial steps of an encapsulation/desiccation based cryopreservation process: importance of thawing method in the case of *Pelargonium* meristems. **Plant Science**, 163: 1121-1127, 2002.
- ESCOBAR, R.H.; MAFLA, G.; ROCA, W.M. A methodology for recovering cassava plants from shoot tips maintained in liquid nitrogen. **Plant Cell Reports**, 16: 474-478, 1997.
- FABRE, J.; DEREUDDRE, J. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. **Cryo-Letters**, 11: 413-426, 1990.

GOLMIRZAIE, A.M.; PANTA, A.; DELGADO, C. Structural observations on potato shoot-tips after thawing from liquid nitrogen. In: ENGELMANN F.; TAKAGI, H. (eds.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm current research progress and application**. JIRCAS/IPGRI, 396-397, 2000.

GONZALEZ-ARNAO, M.T.; PANTA, A.; ROCA, W.M.; ESCOBAR, R.H.; ENGELMANN, F. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 92: 1-13, 2008.

GONZALEZ-ARNAO, M.T.; MÁRQUEZ R, M.; URRA V, C.; MARTÍNEZ M, M.E.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus*) apices by vitrification. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (eds.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. JIRCAS/IPGRI, 398-400, 2000.

HARDING, K.; BENSON, E.E.; SMITH, H. The effects of pre-freeze in vitro culture period on the recovery of cryopreserved shoot-tips of *Solanum tuberosum*. **Cryo-Letters**, 12: 17-22, 1991.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co.Inc, 1940.

MARTÍNEZ, D.; TAMÉS, R.S; REVILLA, M.A. Cryopreservation of in vitro-grown shoot-tips of hop (*Humulus lupulus* L.) using encapsulation/dehydration. **Plant Cell Reports**, 19: 59-63, 1999.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and applications. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, 247: 125-142, 1984.

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

NIINO, T.; SAKAI, A. Cryopreservation of alginate-coated in vitro-grown shoot tips of apple, pear and mulberry. **Plant Science**, 87:199–206, 1992.

NIINO, T.; TASHIRO, K.; SUZUKI, M.; OHUCHI, S.; MAGOSHI, J.; AKIHAMA, T. Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of cherry and sweet cherry by one-step vitrification. **Scientia Horticulturae**, 70:155–163, 1997.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, 59:368-373, 1964.

REINHOUD, P.J.; IREN, F.V.; KIJNE, J.W. Cryopreservation of undifferentiated plant cells. In: ENGELMANN F.; TAKAGI, H. (eds.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm current research progress and application**. JIRCAS/IPGRI, 91-102, 2000.

SAKAI, A. Development of cryopreservation techniques. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (eds.) **Cryopreservation of tropical plant germplasm**. IPGRI, Tsukuba: Japan, 1-7, 1998.

STUSHNOFF, C.; SEUFFERRHELD, M.J.; CREEGAN, T. Oligosaccharides as endogenous cryoprotectants in woody plants. In: LI, P.; CHEN, T. (eds). **Plant cold hardiness**. Plenum Press, New York, 301-309, 1998.

TAKAGI, H. Recent developments in cryopreservation of shoot apices of tropical species. In: ENGELMANN F.; TAKAGI, H. (eds.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm current research progress and application**. JIRCAS/IPGRI, 178-193, 2000.

VERLEYSSEN, H.; BOCKSTAELE, E.V.; DEBERGH, P. An encapsulation–dehydration protocol for cryopreservation of the azalea cultivar ‘Nordlicht’ (*Rhododendron simsii* Planch.). **Scientia Horticulturae**, 106: 402–414, 2005.

WESLEY-SMITH, J.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W.; VERTUCCI, C.W. Ultrastructural evidence for the effects of freezing in embryonic axes of *Pisum sativum* L. at various water contents. **Annals of Botany**, 76: 59-64, 1995.

## CONCLUSÕES GERAIS:

O pré-cultivo em meio de cultura enriquecido com 0,3 M de sacarose foi um fator determinante, para obter maiores índices de sobrevivência dos explantes, quando submetidos à secagem. Este resultado indica que a concentração 0,3M de sacarose foi eficiente na proteção da bicamada lipídica e das proteínas, durante a secagem.

O pré-cultivo dos explantes em 0,75 M de sacarose não foi eficiente na indução de tolerância à secagem e resultou em baixo índice de sobrevivência. Esta concentração foi muito elevada e, provavelmente, causou um choque osmótico nos explantes, quando submetidos à secagem.

A taxa nula no índice de sobrevivência obtida, quando os explantes foram criopreservados, foi resultado de vários fatores. Embora o pré-cultivo tenha se mostrado eficiente na indução da tolerância à secagem, o seu uso mesmo em combinação com diferentes tempos de secagem não foi capaz de induzir a tolerância ao congelamento. Pode-se concluir que a combinação concentração de sacarose X tempo de pré-cultivo X tempo de secagem não foi suficiente para induzir a vitrificação do citoplasma, quando os explantes foram congelados. Em consequência da não vitrificação do citoplasma, ocorreu a formação de cristais de gelo no meio intracelular, resultando a necrose dos tecidos. O ideal seria testar uma prorrogação do tempo de pré-cultivo e da secagem.

Um aspecto, que não foi controlado nestes experimentos e que poderia ter contribuído para a não sobrevivência dos explantes criopreservados, foi o longo período de cultivo *in vitro* (mais de 18 meses). Este maior tempo pode ter reduzido a habilidade dos ápices caulinares de sobreviverem ao congelamento. O maior tamanho e ao número de primórdios foliares do explante adotado, provavelmente, impediram que os tecidos fossem uniformemente desidratados. Assim, quando os explantes foram congelados, ocorreu a formação de cristais de gelo no interior das células, os quais foram responsáveis pela destruição da parede celular, vazamento dos solutos e pela morte dos tecidos.