

# Métodos alternativos para conservação de germoplasma-semente

por Rozane da Cunha \*

## INTRODUÇÃO

O avanço e a modernização da agricultura originou uma dependência cada vez maior na diversidade genética das plantas e na habilidade de se usar esta diversidade para aumentar a produção e qualidade das plantas agrícolas. A coleta e conservação de germoplasma é, portanto, fundamental ao processo de melhoramento genético vegetal.

No entanto, a manutenção da diversidade biológica dos diferentes Biomas não é importante somente para o resgate de genes interessantes para a produção de genótipos especiais. Populações inteiras de espécies florestais de grande valor para a sobrevivência da humanidade têm desaparecido devido a fatores climático e antrópicos, tornando a conservação "ex-situ" destes recursos uma prioridade incontestável.

A conservação de germoplasma-semente a longo prazo já está estabelecida para algumas espécies mas poderia ser uma estratégia mais permanente para a conservação de muitas outras espécies se a tecnologia de armazenamento pudesse ser otimizada.

Superar a deterioração fisiológica de uma amostra de semente armazenada é uma das mais difíceis e importantes tarefas no processo de conservação. Sistemas de refrigeração mecânica, que mantêm a semente desidratada sob temperatura de -20°C aumentam o período de armazenamento. Entretanto a deterioração e a perda de viabilidade ainda podem ocorrer nestes sistemas com o aumento do período de

armazenamento, resultando na perda de precioso material genético.

Dentre as técnicas alternativas para a conservação do Germoplasma de espécies agrícolas, hortícolas e florestais que estão sendo desenvolvidas atualmente, a criopreservação e a ultra-secagem despontam como as mais promissoras.

## CRIOPRESERVAÇÃO

A técnica de criopreservação, isto é, o armazenamento em nitrogênio líquido (NL, - 196°C), proporciona o potencial para uma preservação sem limites de tempo, com a redução do metabolismo a níveis tão baixos que todos os processos bioquímicos são significativamente reduzidos e a deterioração biológica é virtualmente paralizada, (Kartha, 1985). Os outros métodos de conservação somente adiam a deterioração por um período de tempo determinado e específico de acordo com o material e a espécie em questão.

Além disso, esta técnica apresenta as vantagens de oferecer maior segurança quanto à perda de viabilidade e do baixo custo de armazenamento, uma vez que não exige sistemas de refrigeração e de eletricidade.

Até o presente mais de 50 espécies já foram criopreservadas com sucesso (Chin, 1988), através do congelamento em NL de protoplasto, pólen, suspensão celular, calo, ápice caulinar, meristema e embrião (Withers, 1980).

Embora seja possível criopreservar várias partes da planta, Henshaw *et al.* (1980) alertam para o fato de

---

\* *Engenheiro Agrônomo, PhD, Pesquisadora, Conservação de Recursos Genéticos, CENARGEN/ EMBRAPA, Brasília, DF, Brasil.*

que sistemas organizados como sementes e embriões são os mais adequados para a conservação de Recursos Genéticos.

A utilização do NL como um meio de armazenamento pressupõe que as sementes sobrevivam à exposição do NL sem sofrer danos à sua viabilidade.

As sementes podem ser classificadas em três grupos de acordo com sua sensibilidade ao dessecamento e sua tolerância ao NL (Stanwood, 1985).

### Sementes tolerantes ao dessecamento e ao NL

As sementes da maioria das espécies agrícolas e hortícolas são tolerantes ao dessecamento (ortodoxas) e ao congelamento em NL.

A partir de uma relação de 155 espécies e 455 acessos apresentada por Stanwood (1985) cujas sementes mantiveram sua viabilidade após o armazenamento em NL, são apresentadas no Quadro 1, as mais importantes do ponto de vista econômico.

Embora a criopreservação de sementes de muitas espécies ortodoxas já seja uma realidade, durante o estabelecimento da metodologia para cada espécie, alguns fatores devem ser observados com atenção para o sucesso da operação: o teor de umidade da semente, a velocidade de congelamento e de descongelamento, e danos físicos à semente.

### Teor de umidade

O teor de umidade da semente é, provavelmente, o mais crítico fator para o sucesso da criopreservação.

Quadro 1. Espécies cujas sementes sobreviveram ao congelamento em NL. (Dados retirados de Stanwood, 1985).

Espécie	Teor de umidade %	Período de armazenamento	Germinação %	
			Antes	Depois
<i>Allium cepa</i>	8,8	2m	80	94
<i>Apium graveolens</i>	10,2	3a	89	90
<i>Arachis hypogaea</i>	7,3	30d	100	100
<i>Asparagus officinalis</i>	8,6	600d	82	86
<i>Avena sativa</i>	8,4	180d	94	97
<i>Beta vulgaris</i>	6,8	3a	88	90
<i>Brassica oleracea</i>	5,5	3a	95	97
<i>Copisicum annuum</i>	4,3	3a	98	98
<i>Cucumis melo</i>	6,0	3a	96	95
<i>Cucumis sativus</i>	6,3	3a	97	96
<i>Cucurbita pepo</i>	-	48h	100	97
<i>Daucus carota</i>	6,8	3a	81	86
<i>Glycine max</i>	7,1	3a	84	57
<i>Gossypium hirsutum</i>	<13	180d	92	90
<i>Lactuca sativa</i>	4,6	3a	97	98
<i>Lycopersicon esculentum</i>	7,2	3a	90	89
<i>Manihot esculenta</i>	6,3	3h	80	80
<i>Medicago sativa</i>	6,5	3a	86	90
<i>Nicotiana tabacum</i>	4,7	3a	95	92
<i>Oryza sativa</i>	9,7	3a	96	92
<i>Phaseolus vulgaris</i>	7,1	3a	97	99
<i>Pisum sativum</i>	27	1m	100	94
<i>Raphanus sativus</i>	5,1	3a	98	98
<i>Solanum melongena</i>	6,2	180d	95	92
<i>Spinacea oleracea</i>	7,5	3a	95	97
<i>Triticum aestivum</i>	8,8	3a	87	83
<i>Zea mays</i>	8,9	3a	98	93

Se a umidade da semente é muito alta, observa-se a sua morte instantânea durante o processo de congelamento e/ou descongelamento.

Em algumas espécies, como o *Sesamum indicum* (Stanwood, 1985), um nível muito baixo de teor de umidade, pode causar a perda parcial da viabilidade da semente, dependendo do método de congelamento.

Existe um limite máximo de teor de umidade para o congelamento (High Moisture Freezing Limit-HMFL), acima do qual a viabilidade de uma amostra de semente é reduzida durante o congelamento (Stanwood, 1985). Este limite crítico é normalmente uma faixa relativamente estreita de teor de umidade dentro da espécie mas pode variar entre espécies. Exemplos de teor de umidade crítico que vai de 9,6 por cento para sementes de sesamo até 28,5 por cento para feijão são apresentados no Quadro 2.

Quadro 2. Limite máximo de umidade para congelamento (HMFL) de sementes de algumas espécies. (Dados retirados de Stanwood, 1985).

ESPECIE	GERMINAÇÃO		
	HMFL	Umidade abaixo de HMFL	Umidade acima de HMFL
<i>Hordeum vulgare</i>	20,8	98	18
<i>Phaseolus vulgare</i>	27,2	99	84
<i>Brassica oleraceae</i>	13,8	90	0
<i>Cucumis sativus</i>	16,4	98	1
<i>Festuca</i> sp.	23,0	98	2
<i>Allium cepa</i>	24,7	70	0
<i>Raphanus sativus</i>	16,8	99	4
<i>Sesamum indicum</i>	9,3	97	0
<i>Lycopersicon esculentum</i>	18,5	93	0
<i>Triticum aestivum</i>	26,8	96	25

### Velocidade de congelamento e de descongelamento

Para a maioria das espécies a velocidade de congelamento e de descongelamento não é um fator significativo para a sobrevivência de sementes expostas ao NL. No entanto, algumas exceções podem ser

exemplificadas com sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) que, a 19 por cento de teor de umidade mantiveram a viabilidade somente quando sob alta velocidade de congelamento (200°C/min.) e sementes de sesamo (*Sesamum indicum* L.) que, com baixa velocidade de congelamento apresentaram 100 por cento de viabilidade independente do teor de umidade. No entanto, a 200°C/min. a viabilidade foi reduzida junto com o teor de umidade (Stanwood, 1985).

Assim, para algumas espécies a velocidade de congelamento tem o potencial de reduzir a viabilidade dependendo do nível de umidade da semente.

### Danos físicos

O processo de congelamento e descongelamento, passando por extremos de temperatura, impõe grande estresse físico sobre a semente.

Algumas espécies como feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) quando expostas diretamente ao NL, apresentam danos físicos, predominando a separação longitudinal dos cotilédones. No entanto, quando a semente foi imersa na fase de vapor do NL não foi observado nenhum tipo de dano físico. Outras espécies também apresentaram problemas: *Linum usitatissimum*, *Glycine max*, *Medicago sativa* e *Raphanus sativus* (Stanwood, 1985).

Procedimentos práticos para implementar a criopreservação de sementes tolerantes ao dessecamento e ao NL (Stanwood, 1984):

- a. É necessário, inicialmente estabelecer os níveis ótimos de teor de umidade e as taxas de congelamento e descongelamento para cada espécie.

Utilizar de 10 a 100 sementes e um curto período de exposição ao NL (24h). Se ao final do teste de germinação a semente não apresentar danos fisiológicos, toda a amostra pode ser colocada na fase de vapor do NL (-150°C) com um alto nível de certeza de que a amostra será conservada com segurança.

A maioria das sementes tolerantes ao dessecamento e ao NL apresenta porcentagem

total de sobrevivência ao NL quando seu teor de umidade se situa entre 5-10 por cento e a taxa de congelamento varia de 1 a 30°C/min. que é a velocidade de congelamento verificada durante a imersão na fase de vapor no NL.

- b. Equipamento e embalagens: O sucesso da criopreservação depende do uso de um bom equipamento. O tanque de NL adequado deve conter o reservatório de NL e a amostra de semente na mesma cavidade. Estes tanques podem manter a temperatura por um período de tempo de 30 a 120 dias sem necessitar de adição de NL.

A maioria das sementes pode suportar a imersão direta em NL. No entanto, existem indicações de que as sementes armazenadas no vapor acima do NL não sofrem danos físicos, talvez porque a velocidade de congelamento seja mais lenta (em torno de 30°C/minuto) do que na fase líquida (200°C/minuto).

- c. Monitoração da Viabilidade: Teoricamente se uma amostra de semente pode ser congelada em NL e descongelada sem reduzir sua viabilidade, o período de tempo em que a semente pode ficar armazenada em NL, dias, semanas, meses, anos ou séculos é insignificante. No entanto, a prudência recomenda que o controle de qualidade do acesso seja realizado anualmente, pelo menos no início do estabelecimento da metodologia para a espécie em questão.

### Sementes tolerantes ao dessecamento mas sensíveis ao NL

Muitas sementes de espécies frutíferas tais como *Prunus* spp, *Juglans* spp, *Corylus* spp. e *Coffea* spp., apresentam este comportamento durante a criopreservação.

Estas sementes podem ser desidratadas a níveis de umidade menores do que 10 por cento mas não podem suportar temperaturas abaixo de -40°C.

Sementes desta categoria normalmente apresentam grande quantidade de lipídeos de reserva, atingindo até 60 a 70 por cento em algumas espécies.

O desenvolvimento de técnicas adequadas de criopreservação para estas espécies seria a solução para a conservação do seu germoplasma e conseqüentemente daria origem a métodos eficientes de melhoramento e propagação.

### Sementes sensíveis ao dessecamento e ao NL

As sementes sensíveis ao dessecamento, denominadas de recalcitrantes por Roberts (1973), normalmente também apresentam vida curta e são sensíveis a extremos de temperatura.

Muitas tentativas já foram feitas, sem sucesso, para desenvolver uma técnica de preservação a longo prazo para esta categoria de sementes. O desenvolvimento de técnicas criogênicas é o que provavelmente apresenta maior potencial para a conservação do germoplasma de espécies, com sementes recalcitrantes.

A regeneração da planta através do cultivo de meristema e ápices caulinares conservados em NL já foi obtida para as seguintes espécies: *Dianthus caryophyllus* (Vemura & Sakai, 1980), *Cicer arietinum* (Kartha & Gamborg, 1978), *Pisum sativum* (Kartha et al., 1979), *Solanum tuberosum* (Bajaj, 1978), *Fragaria x ananassa* (Kartha et al., 1980) e *Malus* sp. (Katano et al., 1983).

A criopreservação de embriões zigóticos, embora envolvendo o mesmo princípio básico que aquela utilizada para células ou tecidos oferece a vantagem de que o embrião se desenvolve diretamente em plântula. Embriões zigóticos, somáticos e nucleares ou mesmo eixos embrionários têm sido congelados com sucesso para algumas espécies vegetais.

Normah et al., (1986), obteve regeneração de plantas de seringueira a partir de eixos embrionários em NL, o que ilustra o enorme potencial desta técnica para a conservação de germoplasma de espécies com sementes recalcitrantes. Embora a semente recalcitrante seja intolerante ao dessecamento e armazenamento sob baixas temperaturas, seu embrião pode ser desidratado a níveis menores de umidade do que a semente e assim criopreservado com sucesso.

Isto já foi parcialmente obtido e relatado por Grout *et al.*, (1983) para *Elaeis guinensis*, Pritchard e Prendergast (1986) para *Araucaria hunsteinii*, Chin *et al.* (1988) para *Veitchia merrillii* e *Houvea fosteriana* e Krishnapillay *et al.* (1990) para *Artocarpus heterophyllus*.

## ULTRA-SECAGEM

É fato conhecido que o teor de umidade da semente e da temperatura de armazenamento são os mais importantes fatores que afetam a longevidade da semente durante o armazenamento e o mais comum e seguro método para a conservação de germoplasma é o armazenamento frio, com a semente apresentando teor de umidade entre 5 e 10 por cento a 20°C de temperatura.

Se a redução do teor de umidade abaixo de 5 por cento pode induzir efeitos negativos sobre a germinação e vigor de semente ainda é passível de controvérsias.

Recentes experimentos realizados na University of Reading, UK, mostraram que a ultra-secagem de sementes ortodoxas, abaixo de 5 por cento de teor de umidade não prejudicou sua viabilidade e aumentou sua capacidade de armazenamento.

Esta técnica poderia ser desenvolvida para os países mais pobres, uma vez que os gastos com câmaras a temperaturas de -20°C seriam eliminados. As sementes poderiam ser desidratadas a níveis abaixo de 5 por cento e hermeticamente acondicionadas em embalagens impermeáveis e armazenadas sob temperatura ambiente.

Embora bastante promissora esta nova tecnologia ainda está em fase experimental para determinar se distúrbios genéticos, citológicos ou fisiológicos poderiam ocorrer a longo prazo.

Os principais resultados de experimentos realizados durante 2,5 anos em Beijing, na China, por Guang-Hua (1991) são apresentados a seguir:

1. Entre os vários métodos utilizados para secar as sementes, o mais efetivo, seguro e econômico foi

a sílica gel em dessecadores sob a temperatura ambiente.

2. Para prevenir danos à morfologia e estrutura da célula em algumas espécies é necessário fazer um pré-tratamento antes da ultra-secagem. Este tratamento consiste na hidratação e desidratação da semente, sendo que o tratamento repetido foi mais eficiente que um único tratamento.
3. Testes com sementes oleaginosas com diferentes espécies de *Brassica* sp., *Arachis* sp., *Sesamum* sp. *Glycine* sp. confirmaram que a ultra-secagem não induziu nenhuma significativa modificação na germinação e vigor. Além disso as sementes ultra-secas foram mais tolerantes ao envelhecimento acelerado do que as sementes do controle.
4. Sementes de *Brassica* spp., *Beta vulgaris*, *Glycine max*, *Eucommia ulmoides*, *Arachis hypogaea*, *Asparagus officinalis* *Oenothera odorata*, *Sesamum indicum*, *Sorghum vulgare*, *Ulmus pumila*, *Populus* spp. etc. foram submetidas à ultra-secagem e nenhum efeito deletério foi detectado, após análises ultra-estruturais, bioquímicas e fisiológicas.

## LITERATURA CITADA

- BAJAJ, Y.P.S. 1980. Tuberization in potato plants regenerated from freeze preserved meristems. *Crop. Impr.* 5: 137-40.
- CHIN, H.F.; KRISHNAPILLAY, B. & ALANG, G.G. 1988. Cryopreservation of *Veitchia* and *Houvea* palm embryos: non-development of the haustorium. *Cryoletters.* 9:372-379.
- GROUT, B.W.W.; SHELTON, K. & PRITCHARD, H.W. 1983. Orthodox behaviour of oil palm seed and cryopreservation of the excised embryo for genetic conservation. *Ann. Bot.* 52: 381-384.
- GUANG-HUA, Z. 1991. Research on ultra-dry seeds. 4th Progress report. IBPGR, Rome, Italy.
- HENSHAW, G.G.; STAMP, J.A. & WESTCOTT, J.J. 1980. Tissue cultures and germplasm storage. In: Sala, F.; Parisi, B.; Cella, R & Ciferri, O. (eds.). *Plant Cell Cultures: results and perspectives: 277-282.* Elsevier, Amsterdam.

- KARTHA, K.K. & GAMBORG, O.L. 1978. Meristam culture techniques in the production of disease-free plants and freeze-preservation of germplasm of tropical tuber crops and grain legumes. In: Maraite, H. & Mayer, J.A. (eds.) Diseases of Tropical Food Crops, Université Catholique, Louvain, Belgium.
- ; LEIVNG, N.L. & GAMBORG, O.L. 1979. Freeze-preservation of pea meristems in liquid nitrogen and subsequepte plant regeneration. *Plant Sci. Lett.*, 15: 7-16.
- ; LEIVNG, N.L. & PAHL, K. 1980. Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 105(4): 481-484.
- KATANO, M.; ISHIHARA, A. & SAKAI, A. Cryopreservation of shoot apices of apple winter buds. *Hort. Sciences*, 18: 707-8.
- KRISHNAPILLAY, B.; MARZALINA, M. & YAP, S.K. 1990. Is long term storage of forest seeds possible? *Malaysium forestry and forest products research*. p. 66-78.
- NORMAH, M.N.; CHIN, H.F. & HOR, Y.L. 1986. Desiccation and cryopreservation of embryonic axes of *Hevea brasiliensis* Muell. *Arg. Pertanika*, 9(3): 299-303.
- PRITCHARD, H.W. & PRENDERGAST, F.G. 1986. Effects of the recalcitrant seed species *Araucaria hunsteinii* K. Schum. *J. Exp. Bot.* 37: 1388-1397.
- ROBERTS, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology*, 1: 499-514.
- STANWOOD, P.C. & BASS, L.N. 1981. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. *Seed Sci. Technol.* 9: 423.
- . 1984. Cryopreservation of seeds. IBPGR report second meeting, IBPGR Advisory Committee on Seed Storage, Appendix III. IBPGR Secretariat, Rome.
- . 1985. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation In: *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*, K.K. Kartha, ed. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- VEMURA, M. & SAKAI, A. 1980. A survival of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot apices frozen to the temperatura of liquid nitrogen. *Plant Cell Pysiol*, 21 (1): 85-94.
- WITHERS, L.A. 1980. Tissue culture storage for genetic conservation. IBPGR Technical Report. IBPGR Secretariat. Rome.