



Fotos cedidas pelo autor

Conservação de Germoplasma *in vitro*

Maria Lucía Carneiro Vieira

Dra. Profa. Associada do

Departamento de Genética

Escola Superior de Agricultura

"Luiz de Queiroz" / Universidade de São Paulo

mlcvieir@carpa.ciagri.usp.br

Tecnologias *in vitro* aplicadas à conservação de recursos genéticos vegetais

Germoplasma representa o conjunto de materiais hereditários de uma espécie. Segundo Towill (2000), este conceito pode ser restrito ao conjunto de genótipos disponíveis para melhoramento de uma espécie cultivada. A diversidade contida em um germoplasma deve ser protegida de eventuais perdas para garantir a sua utilização, e tem sido coletada nos centros de origem das culturas, isto é, nos locais onde se deram início os cultivos daquela espécie, ou nas regiões onde se desenvolveram raças locais, para as quais houve migração da cultura.

A conservação de recursos genéticos implica na manutenção de coleções *in situ*, ou seja, nos seus locais de ocorrência, ou *ex situ*. Nesse caso, podem ser mantidos indivíduos, sementes, embriões ou outras estruturas vegetais, sob diferentes condições, dependendo do material utilizado: no campo ou em casas de vegetação, em câmaras secas sob baixa temperatura, em meio de cultura com baixa concentração salina (conservação *in vitro*) ou criopreservadas.

As coleções de germoplasma têm sido mantidas em instituições diversas que têm por responsabilidade (I) garantir a sua diversidade genética (seja pela iniciativa de coletar periodicamente recursos genéticos, seja por favorecer o intercâmbio com outros bancos de germoplasma), (II) multiplicá-las, (III) distribuí-las aos usuários e (IV) promover a sua caracterização por diferentes metodologias. Essas coleções são ditas *ativas*.

Uma segunda forma de conservação é aquela que propõe manter as coleções por períodos longos, sem que se utilize delas para estudo, cessão, intercâmbio, etc. O modo mais usual para se manter uma coleção por prazos mais longos é por criopreservação, isto é, sob temperatura ultra-reduzida. Neste caso, são denominadas de *Coleções de Base*.

A maioria das sementes tolerantes à desidratação (ou dessecação) sobrevive a tratamentos criogênicos, isto é, a temperaturas abaixo de 130°C. Nesse estado, muitas das reações celulares que levam à deterioração são minimizadas e se obtêm longevidade extremamente alta, isto é, por dezenas de anos. Na prática, devido ao seu custo relativamente baixo, utiliza-se nitrogênio líquido (LN, -196°C) ou o seu vapor (-150 a -180°C) para a conservação dessas sementes.

Sementes sensíveis à dessecação, ditas recalcitrantes, são comuns em espécies aquáticas, plantas de sementes grandes, certas espécies tropicais e algumas arbóreas nativas de áreas temperadas. O coco, o cacau, a manga e a seringueira são alguns exemplos de plantas com sementes recalcitrantes. Sob baixa temperatura e relativa umidade, sua viabilidade pode se manter por poucas semanas ou até por alguns meses, o que representa muito pouco em termos de conservação. Usualmente, essas espécies são conservadas *ex situ*, isto é, a campo, o que é extremamente caro e laborioso. Da mesma maneira, populações com elevada heterozigosidade (I), coleções de plantas com períodos juvenis muito longos (II),

ou cujas sementes são produzidas em pouca quantidade (III), com viabilidade reduzida (IV) ou quando esta se mantém por pouco tempo (V), são mantidas vegetativamente, a campo ou em casa de vegetação.

As tecnologias, ditas *in vitro*, apresentam estratégias importantes para a conservação de plantas com sementes recalcitrantes, de viabilidade baixa ou em número reduzido: culturas de embriões zigóticos e eixos embrionários isolados, derivados de sementes maduras, normalmente sobrevivem à dessecação parcial e ao congelamento, da mesma forma que ápices caulinares e gemas podem ser criopreservadas. Em certos casos, especialmente em espécies cujos ciclos de florescimento ocorrem muito distanciadamente ou em períodos efêmeros, usa-se criopreservar os grãos de pólen, os quais podem ser, posteriormente, utilizados em cruzamentos controlados.

Os sistemas *in vitro* não eliminam a importância de se manter clones *in vivo*. São coleções que se complementam e ambas podem se constituir em bancos ativos. Entretanto, é dispendioso manter essas coleções, principalmente em locais distintos.

A criopreservação é uma técnica que permite manter o germoplasma por vários anos (*long term storage*) sob temperatura ultra-reduzida, em geral, -196°C. Nessa temperatura, a movimentação de moléculas é super reduzida e não há fase líquida na célula. Os riscos de perda do material biológico são menores e os custos mais baixos em relação aos da conservação *in vitro*. Podem ser criopre-

servados ápices e gemas, embriões somáticos e zigóticos, células em suspensão e até protoplastos, ou seja, células desprovidas da parede celular. *A priori*, é preciso otimizar protocolos visando garantir a regeneração de plantas inteiras a partir das estruturas criopreservadas.

Todos os procedimentos de criopreservação têm uma etapa em comum, que é a de preparar a estrutura vegetal a ser conservada para a imersão em LN. É uma etapa de desidratação para evitar a formação de cristais de gelo no interior da célula, o que é fatal. A desidratação pode ser induzida por cristalização do meio externo durante uma fase lenta de resfriamento até atingir - 30 a - 40° C. Transferindo-se rapidamente o material vegetal para o LN, obtém-se a *vitrificação* da célula, isto é, os componentes celulares solidificam, formando *um vidro*, sem haver formação de gelo.

Outra alternativa, é submeter o material a agentes crioprotetores, à base de DMSO, glicerol, sacarose, etileno glicol etc. Primeiramente, se utilizam soluções com baixas concentrações para que haja entrada dos componentes permeáveis na célula e, em seguida, soluções concentradas de crioprotetores para promover a vitrificação, para então, transferir os frascos para o nitrogênio líquido.

Em algumas situações, a imersão em LN pode ser direta, desde que os ápices caulinares sejam pré-tratados em solução osmótica de concentração moderada, uma vez que a desidratação é necessária antes de haver a vitrificação.

É possível também criopreservar ápices, embriões somáticos encapsulados em alginato de sódio (3 a 5 mm). Essa técnica é conhecida por *encapsulação*. As cápsulas são mantidas em meio de cultura contendo 0,5 a 0,7 M de sacarose sob agitação, *overnight* (etapa de desidratação), sendo, então, lavadas e colocadas em ampolas que serão mantidas em LN. Trata-se de uma variação da vitrificação utilizando-se encapsulação em alginato, cultivo em sacarose, desidratação sob fluxo de ar, seguindo-se o congelamento rápido. Há registros de coleções de batata, uva, cravo e pera, usando-se brotos encapsulados (Towill, 2000).

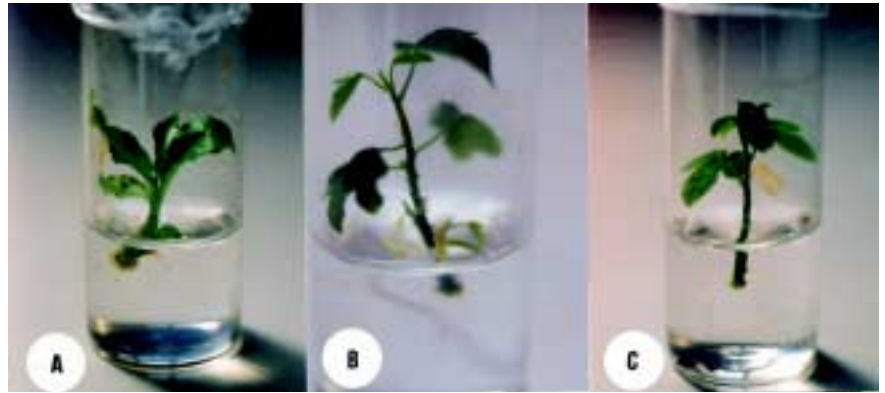


Figura 1. Clones da Coleção de espécies exóticas de *Passiflora*, mantida *in vitro* no Departamento de Genética da ESALQ/USP: *P. edulis* f. *flavicarpa* (A), *P. amethystina* (B) e *P. cincinnata* (C).

Um parâmetro importante deve ser definido para cada procedimento: é o *storage time*. É o tempo que um material pode ser conservado de tal forma que, quando avaliado, mostre pelo menos 60 % de sobrevivência (Van den Houve *et al.*, 1995). Só podem ser recomendados protocolos nos quais a sobrevivência tiver sido avaliada e registrada.

Na tabela 1, são apresentadas as etapas para se criopreservar e recuperar ápices caulinares, as quais podem ser utilizadas em sala de aula, a título de exercício. Toda a manipulação deve ser feita em câmara de fluxo laminar usando soluções, vidrarias e instrumentos previamente esterilizados, com exceção da etapa de congelamento, que pode ser feita na bancada do laboratório. A solução PVS2 (Sakai *et al.*, 1991) contém glicerol, DMSO e etileno glicol e deve ser preparada em meio aquoso contendo sais e vitaminas de MS (Murashige & Skoog, 1962) e 0,4 M de sacarose. Essa solução deve ser filtro-esterilizada. A solução contendo 2 M de glicerol + 0,4 M de sacarose (Matsumoto *et al.*, 1994) deve ser diluída em meio MS e autoclavada. O meio de diluição (ou de cultivo), usado para remover a solução de vitrificação, contém sais e vitaminas de MS + 1,2 M de sacarose + 100 mgL⁻¹ de mio-inositol (pH 5,7). As repetições (tubos) devem conter 4 ápices.

Manutenção das coleções em meio de cultura

Outra alternativa de conservação

in vitro de germoplasmas é aquela em que as coleções são introduzidas em laboratório, a partir de diferentes estruturas da planta (explantes) e mantidas sob condições assépticas. Essas coleções podem ser estabelecidas a partir da germinação de sementes *in vitro* ou por cultura de ápices caulinares ou gemas, sob temperatura de 25 a 28°C. Esse procedimento é pouco prático e laborioso pois exige subculturas mensais, só se prestando, portanto, para pequenas coleções. Normalmente o que se faz é baixar a temperatura da sala para 15 até 20°C, de tal maneira a obter crescimento mínimo *in vitro* e reduzir as trocas de meio de cultura para uma ao ano. Dessa forma, por exemplo, são conservados cerca de 1.600 acessos de mandioca na Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, na Bahia. Por outro lado, esse método tem a vantagem de garantir maior segurança aos procedimentos de intercâmbio de germoplasma, uma vez que o material vegetal é introduzido, mantido e transportado sob condições assépticas, isto é, dentro do frasco de cultura.

Em certos casos, a manutenção da coleção em meio de cultura requer a adição de fitorreguladores que podem, eventualmente, provocar alterações genéticas. A própria condição *in vitro* pode ser estressante para a planta, levando-a a instabilidade genética. Faz-se necessário, portanto, avaliar esses efeitos, periodicamente, utilizando metodologias moleculares (marcadores de DNA ou protéicos) e citogenéticas.

Coleções de germoplasma tropical têm sido conservadas *in vitro* ou criopreservadas na Embrapa - Cenargen, em Brasília, Brasil; no CIRAD, em Montpellier, França; no INIBAP, em Leuven, Bélgica, e em várias outras instituições no Japão, na Itália, etc. O Departamento de Genética da ESALQ/USP dispõe de uma pequena coleção *in vitro* de *Passiflora* (Figura 1), na qual há cerca de 20 espécies silvestres, acessos comerciais de maracujá azedo e híbridos somáticos, obtidos por fusão de protoplastos (Vieira & Dornelas, 1996).

Cabe novamente enfatizar que as alternativas de conservação *in vitro* são extremamente úteis na conservação de espécies com sementes recalcitrantes ou grandes, de plantas de propagação vegetativa ou de certas arbóreas, na eliminação de patógenos e para facilitar o transporte de germoplasmas. Consultando o *site* da FAO, via internet, podem-se encontrar muitas informações interessantes sobre bancos de germoplasma, espécies e acessos disponíveis e técnicas de conservação. Para informações sobre aspectos genéticos relativos à conservação de germoplasma, recomenda-se a leitura de Morales et al. (1997).

Literatura citada

Matsumoto, T.; Sakai, A.; Nako, Y. 1994. Cryopreservation of in-vitro grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. *Plant Cell Rep.* 13: 442-446.








Murashige, T & F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497

Sakai, A.; Kobayashi, S.; Oiyama, I. 1991. Survival by vitrification of nucellar cells of Navel Orange (*Citrus sinensis* var. *brasiliensis* Tanaka) cooled to -196 °C. *J. Plant Physiol.* 137: 465-470.

Towill, L. E. 2000. Germplasm preservation. In: R. N. Trigiano & D. J. Gray (Ed.) *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*. 2nd. Edition. CRC Press, Boca Raton, pp. 337-353.

Vieira, M. L. C.; Dornelas, M. C. 1996. Regeneration of plants from protoplasts of *Passiflora* species (Passion Fruit). In: Y.P.S. Bajaj (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 38, *Plant Protoplasts and Genetic Engineering VII*, pp. 108-119. Springer Verlag, Berlin.

Tabela 1. Etapas da criopreservação e recuperação de ápices caulinares (Towill, 2000)

PASSO	INSTRUÇÕES
	1 Separe ápices caulinares com o auxílio de uma lâmina de bisturi ou agulha hipodérmica; o ápice deve apresentar 1mm de cerca de 4 primórdios foliares); trabalhe rapidamente para evitar dessecação; escolha plantas saudáveis para a excisão dos ápices; como controle, cultive individualmente ápices <i>in vitro</i> (passo 9).
	2 Incube os brotos em uma placa de petri em meio de cultura contendo 0,3 M de sacarose durante 1 a 2 dias, à temperatura ambiente.
	3 Remova o líquido com uma pipeta Pasteur e adicione 2 M de glicerol + 0,4 M de sacarose, incube por 1 hora, à temperatura ambiente; remova parte dos brotos, lave (passo 8) e cultive-os (passo 9) para verificar se o glicerol + sacarose causam injúria.
	4 Remova o glicerol + sacarose do restante dos brotos e adicione 0,5 mL de solução de vitrificação (PVS2), previamente resfriada; incube no gelo por 30 min.
	5 Cinco min antes do término da incubação, transfira 5 brotos para os criotubos de plástico, recobrando-os com 0,25 mL de PVS2.
	6 Após 30 min, use 4 repetições para expor ao nitrogênio líquido e 4 para transferir diretamente ao passo 9.
	7 Cubra os tubos e aqueça-os em banho-maria a 40°C e a 22°C, deixando-os por 1 min. em cada tratamento.
	8 Remova a água do exterior do tubo com etanol 70%; imediatamente retire os brotos do tubo com pinça ou pipeta Pasteur; incube os explantes por 30 min. no meio de diluição.
	9 Remova os brotos do meio de diluição e coloque-os em meio de sólido em pequenas placas de petri; remova todo o excesso de líquido ao redor do explante; sele a placa com parafilme.
	10 Incube a placa no escuro por uma semana e depois para as condições de luz indicadas àquela espécie; subcultive os ápices a cada 28 dias.

