



## Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de algodoeiro

**Kilson P. Lopes<sup>1</sup>, Francisco de A. C. Almeida<sup>2</sup>,  
Julita M. F. C. Carvalho<sup>3</sup> & Riselane de L. A. Bruno<sup>4</sup>**

### RESUMO

A busca por cultivares cada vez mais adaptadas que atendam à demanda vigente, exige que os recursos genéticos das espécies vegetais sejam facilmente obtidos. Objetivando avaliar um protocolo para criopreservação de eixos embrionários de algodoeiro, realizou-se um experimento com o emprego de sementes das cultivares BRS 200 e BRS 201, cujos eixos embrionários foram extraídos e submetidos à dessecação por 0, 30, 60 e 90 min e à criopreservação em nitrogênio líquido (-196 °C) durante 0, 5, 30 e 60 dias. A reativação dos eixos embrionários foi realizada a cada período de armazenamento após sua retirada e descongelamento em condições de ambiente, durante 60 min, sendo cultivados em meio MS em condições de câmara regulada a uma temperatura de 25 °C, fotoperíodo de 16/8 h (claro/escuro) e intensidade luminosa de 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Aos 30 dias de cultivo foram realizadas avaliações da regeneração, comprimento de plântulas e número de raízes emitidas. Eixos embrionários de algodoeiro, com umidade em torno de 9,7%, podem ser conservados em bancos de germoplasma em condições criogênicas e regenerar mais de 80% de plântulas in vitro após 60 dias de armazenamento em nitrogênio líquido (-196 °C).

**Palavras-chave:** recurso genético, dessecação, armazenamento, regeneração

## Cryopreservation of zygotic embryos axes of cotton

### ABSTRACT

The search for cultivars more adapted that assist the effective demand requires that the genetic resources of plant species are obtained easily. In order to evaluate a protocol for cryopreservation of embryonic axes of cotton, an experiment was carried out using seeds of the cultivars BRS 200 and BRS 201, which were extracted from embryonic axes and subjected to drying for 0, 30, 60 and 90 min and to the cryopreservation, directly plunged into liquid nitrogen (-196 °C), during 0, 5, 30 and 60 days. The regrowth of the embryonic axis was accomplished for each storage period, after its removal and thawing at room temperature conditions for 60 min, being cultivated in MS medium and kept in the incubator room at temperature of 25 °C, photoperiod of 16/8 h (light/dark) and light intensity of 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . After 30 days of cultivation, evaluations of the regeneration, seedling length and number of roots were accomplished. Embryonic axes of cotton, with moisture content around 9,7%, can be conserved in germoplasma banks in cryogenic conditions and to regenerate more than 80% of plantlets in vitro after 60 days of storage in liquid nitrogen (-196 °C).

**Key words:** genetic resource, drying, storage, regeneration

<sup>1</sup> UAGRA/CCTA/UFCG. R. Jairo Vieira Feitosa, 1770, CEP 58840-000, Pombal, PB. Fone: (83) 3431-3000. E-mail: [kilson@ccta.ufcg.edu.br](mailto:kilson@ccta.ufcg.edu.br)

<sup>2</sup> UAEA/CCT/UFCG. Av. Aprígio Veloso 882, Bairro Universitário, CEP 58429-140, Campina Grande, PB. Fone: (83) 2101-1550. E-mail: [almeida@deag.ufcg.edu.br](mailto:almeida@deag.ufcg.edu.br). Bolsista de produtividade em pesquisa do CNPq

<sup>3</sup> Embrapa Algodão, R. Oswaldo Cruz, 1143, CEP 58107-720, Campina Grande, PB. Fone: (83) 3182-4300. E-mail: [Julita.carvalho@embrapa.br](mailto:Julita.carvalho@embrapa.br)

<sup>4</sup> UFPB, Campus II Cidade Universitária S/N, CEP 58397-000, Areia, PB. Fone: (83) 3362-2300. E-mail: [riselane@pq.cnpq.br](mailto:riselane@pq.cnpq.br). Bolsista de produtividade em pesquisa do CNPq

## INTRODUÇÃO

As pesquisas visando ao melhoramento genético do algodoeiro têm sido conduzidas de modo contínuo, lançando-se cultivares cada vez mais adaptadas às diversas condições com características que atendam às demandas vigentes, tanto dos produtores como da indústria têxtil e dos beneficiadores. Constatou-se, recentemente, o interesse em se obter cultivares de algodoeiro com fibras coloridas porém com a visão de preservação do germoplasma das melhores linhagens desenvolvidas.

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

Em plena mudança global, em que os ecossistemas enfrentam grandes mudanças climáticas e fortes pressões antropogênicas, a erosão e a perda de diversidade genética constituem uma realidade cada vez mais presente; desta forma, a conservação dos recursos genéticos se destaca como prioridade estabelecida e reconhecida em nível mundial.

Tradicionalmente, a conservação é agrupada em duas categorias: na conservação *in situ* e *ex-situ*; consoante a conservação das espécies, populações ou habitats é realizada, prioritariamente, no local ou fora do local de origem; neste caso, podem ser mantidos indivíduos, sementes, embriões ou outras estruturas vegetais em diferentes condições, dependendo do material utilizado: no campo ou em casa de vegetação, em câmara seca sob baixa temperatura, em meio de cultura com baixa concentração salina ou criopreservadas (Slageren, 2003; Wetzel et al., 2007).

A semente é a forma mais comum de conservação *ex-situ*, por ser a unidade de propagação natural para a maioria das espécies de plantas superiores (Veiga et al., 2006). A metodologia convencional compreende sua desidratação para teores de umidade extremamente baixos e armazenamento em câmaras com controle de temperatura e umidade relativa. Essas condições permitem a preservação de material vegetal por longos períodos de tempo, porém pode ocorrer perda da viabilidade com o prolongamento do armazenamento, dependendo da espécie (Meletti et al., 2007).

A criopreservação vegetal ou armazenamento de propágulos vegetais em temperatura ultrabaixa (-196 °C) geralmente no nitrogênio líquido (LN) é a única opção disponível em conservação segura e rentável, em longo prazo, dos tecidos que seriam recuperados por meio de protocolos para a manipulação posterior. Protocolos de criopreservação têm sido desenvolvidos para mais de 80 diferentes espécies de plantas cultivadas sob várias formas, incluindo suspensões de células, calos, ápices, embriões somáticos e zigóticos (Sharma, 2005). Esta técnica de conservação dos recursos genéticos vegetais tem apresentado bons resultados em virtude de reduzir muito ou praticamente paralisar qualquer atividade em nível celular minimizando a deterioração biológica durante o armazenamento (Martinková & Honek, 2007; Tresena et al., 2009).

Segundo Toribio & Celestino (2000) a criopreservação pode ser uma ferramenta de grande utilidade para a conservação de recursos genéticos vegetais, sobretudo do algodoeiro; contudo,

Kumria et al. (2003) relatam que a regeneração e transformação de algodão apresentam problemas no desenvolvimento da bioengenharia por serem dependentes do genótipo e de protocolos reproduzíveis que ainda não foram bem trabalhados para a maioria das variedades elites de algodão.

González-Benito et al. (1998) afirmam que para assegurar o ótimo de germinação após imersão em nitrogênio líquido, as sementes de algodão devem ser dessecadas previamente para teor de umidade em torno dos 3%. Rocha (2004); Rocha et al. (2009) e Almeida et al. (2010) afirmam estar entre 5 e 9% (b.u.) o teor de água limite para a criopreservação de sementes de algodoeiro.

Atualmente, a criopreservação de eixos embrionários vem se destacando como a metodologia mais apropriada para a conservação em longo prazo da diversidade genética das espécies vegetais, uma vez que os eixos toleram condições que seriam letais para a semente inteira (Berjak et al., 2000; Santos et al., 2002; Carlo & Lambardi, 2005). González-Benito et al. (1998) resgataram, *in vitro*, eixos embrionários de algodoeiro criopreservados com teor de água abaixo de 20%, sem perda da viabilidade.

Embriões zigóticos são sistemas de tecidos simples, altamente organizados, que podem produzir uma planta completa, reduzindo o risco de variação somaclonal, como observado em outros métodos de regeneração de plantas *in vitro* e usados com sucesso para criopreservação do germoplasma de muitas espécies vegetais que possuem sementes com problemas no armazenamento (Berjak et al., 2000).

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

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Centro Nacional de Pesquisa do Algodão (Embrapa Algodão) em Campina Grande, PB. Utilizaram-se sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), cultivares BRS 200 (pluma marrom) e BRS 201 (pluma branca).

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

Após esterilização as sementes permaneceram em embebição, durante 24 h, em água bidestilada esterilizada e foram então levadas para excisão de seus eixos embrionários na câmara de fluxo laminar, onde foram submetidas à dessecação por 0, 30, 60 e 90 min, sob temperatura de 25 ± 2 °C sendo, em

seguida, colocadas em recipientes estéreis de polipropileno de 4,5 mL, em número de quatro réplicas de 10 eixos embrionários por frasco e imersos diretamente no nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , onde permaneceram 0, 5, 30 e 60 dias.

Após cada período de dessecação foram separadas três repetições de 30 eixos embrionários para determinação do teor de água, no momento de sua criopreservação, por meio da pesagem e secagem em estufa regulada a  $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 17 h, conforme recomendado pelo ISTA (1985); o teor de água foi expresso em porcentagem, com base no peso fresco.

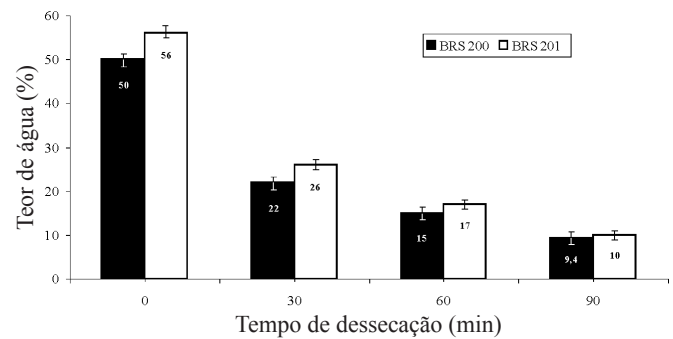
Após cada período de criopreservação, criotubos contendo os eixos embrionários foram retirados e postos para descongelar em temperatura ambiente ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) durante 60 min; posteriormente, os eixos embrionários foram cultivados em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, contendo 10 mL de meio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

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

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sementes de algodoeiro das cultivares BRS 200 e BRS 201 com umidade entre 6 e 8%, foram submetidas a embebição, por 24 h, e apresentaram eixos embrionários com teor de água médio de 53%, após excisão (Figura 1). Quando os eixos embrionários foram submetidos à dessecação em câmara de fluxo laminar, ocorreu redução do teor de água em valores médios, para ambas as cultivares, da ordem de 24, 16 e 9,7%, após 30, 60 e 90 min de dessecação, respectivamente. A redução de água dos eixos embrionários em um nível possível de submetê-lo à temperatura do nitrogênio líquido e/ou evitar a formação de cristais de gelo é o passo mais crítico na obtenção de um protocolo viável de criopreservação, confirmado por Toribio & Celestino (2000) esclarecendo, ainda, que, em geral, as sementes, os embriões e os eixos embrionários, se criopreservam prévio a desidratação por ar.

A análise de variância (Tabela 1) detectou efeitos significativos para a maioria das variáveis estudadas, excetuando a interação dupla entre cultivar x armazenamento, na porcentagem de regeneração; a interação dupla entre cultivar x dessecação, assim como a interação entre todas as variáveis (cultivar x



Barras representam a média de três réplicas em cada tratamento

**Figura 1.** Teor de água, em porcentagem, de eixos embrionários oriundos de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) cultivares BRS 200 e BRS 201, submetidas à dessecação em câmara de fluxo laminar

**Tabela 1.** Resumo da análise de variância da regeneração, comprimento de plântula e número de raízes emitidas por eixos embrionários de duas cultivares de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), submetidos à dessecação e ao armazenamento em nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ )

Fontes de variação	Grau de liberdade	Quadrados médios		
		Regeneração (%)	Comprimento de plântula (cm) <sup>1</sup>	Número de raízes emitidas
Cultivar (C)	1	1444,531**	9,4053**	3879,374**
Dessecação (D)	3	29557,030**	13,5607**	3586,057**
Armazenamento (A)	3	9165,364**	6,1467**	2058,613**
C x D	3	440,365 *	0,8764 <sup>ns</sup>	363,104**
C x A	3	119,531 <sup>ns</sup>	1,5356**	166,114**
D x A	9	3418,142**	4,1988**	445,322**
C x D x A	9	170,920 *	0,5467 <sup>ns</sup>	27,547**
Resíduo	96	75,26041	0,375586	7,333927
Total	127			
CV (%)		12,66	23,95	12,81

\*\* Significativo a 0,01 de probabilidade; \* Significativo a 0,05 de probabilidade; <sup>ns</sup> Não significativo; <sup>1</sup> Dados transformados em  $(X + 1)^{1/2}$

dessecação x armazenamento) não afetaram o comprimento de plântulas originadas dos eixos embrionários de algodoeiro.

Eixos embrionários de algodoeiro da cultivar BRS 201 submetidos a criopreservação, apresentaram maior regeneração quando comparados com os da cultivar BRS 200, apesar desta superar aquela, no comprimento de plântula e no número de raízes emitidas por seus eixos embrionários (Tabela 2). Tais resultados indicam que as diferenças apresentadas entre cultivares e/ou variedades de uma mesma espécie, quando submetidas a criopreservação, se devem, provavelmente, ao patrimônio genético de cada variante não havendo efeitos da criopreservação sobre a viabilidade e/ou vigor das cultivares estudadas, estando esta afirmação de acordo com Almeida et al. (2002) e Cavalcanti Mata et al. (2002). Todavia, Coelho (2006) que trabalhou com a qualidade fisiológica de sementes de diferentes cultivares de algodão durante a exposição às temperaturas ultrabaixas, observou que a germinação da cultivar BRS 200 marrom é afetada negativamente pela utilização da criopreservação constatando um decréscimo nesses valores, com o decorrer do armazenamento.

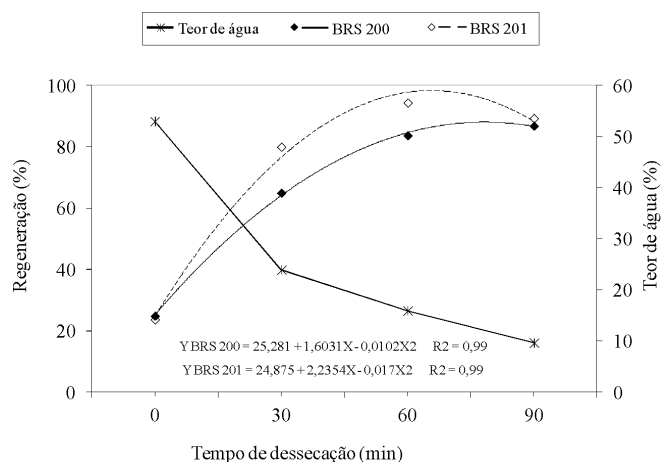
**Tabela 2.** Valores médios de regeneração, comprimento de plântula e número de raízes emitidas por eixos embrionários de duas cultivares de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) submetidos ao armazenamento em nitrogênio líquido (-196 °C)

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

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

<sup>1</sup> Dados transformados em  $(X + 1)^{1/2}$

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

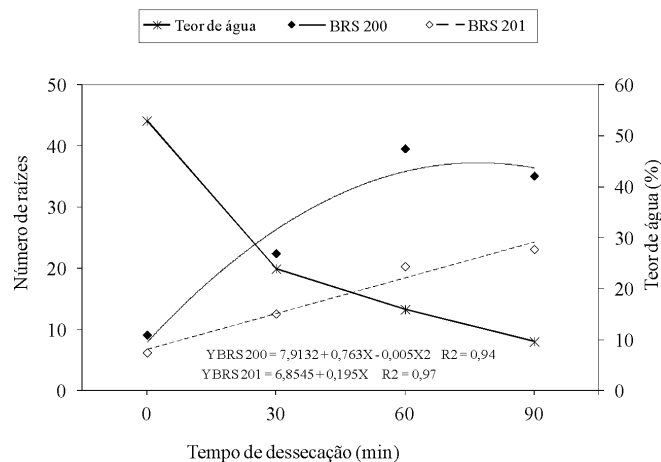


**Figura 2.** Porcentagem de regeneração de eixos embrionários de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) cultivares BRS 200 e BRS 201, em função do tempo de dessecação em câmara de fluxo laminar e do teor de água, sob o armazenamento em nitrogênio líquido (-196 °C)

pode ser facilmente realizada mantendo-se a ressalva de que o material criopreservado pode apresentar diferenças no posterior desenvolvimento das plantas. Ante o abordado, Al Zoubi & Normah (2012) afirmam que baixos conteúdos de umidade reduzem a formação de gelo nas estruturas intracelulares da semente, quando expostas às temperaturas subzero atenuando, assim, prováveis danos decorrentes do congelamento. Santos et al. (2002) obtiveram total regeneração (100%) in vitro de eixos embrionários de sementes de café com 12,6% de umidade, após congelamento em nitrogênio líquido; já Goldfarb et al. (2010) relatam que teores de água de sementes inferiores a 8% (b.u.) tornam o material biológico mais favorável ao congelamento, uma vez que evita a formação de gelo o que favorece danos ao tecido.

O número de raízes emitidas por eixos embrionários também sofreu alteração após criopreservação, em função do teor de água que os mesmos continham após cada tempo de dessecação (Figura 3). Um número maior de raízes (37 raízes/plântula) foi obtido para eixos embrionários criopreservados da cultivar BRS 200, aos 76 min de dessecação; já o número de raízes emitidas de eixos embrionários da cultivar BRS 201, após criopreservação, apresentou tendência linear crescente, a medida em que houve redução no teor de água, na dessecação. Com base no observado, a dessecação contribui na capacidade regenerativa dos eixos embrionários de sementes do algodoeiro criopreservados, garantindo a regeneração de plântulas com um número maior de raízes (Figura 3) e, conseqüentemente, mais vigorosas (Figura 2). Portanto, a maior emissão de radícula indica que os eixos embrionários foram dessecados em um nível de teor de água que não causou danos às suas células após criopreservação.

O estudo conjunto dos efeitos do tempo de dessecação e do período de armazenamento dos eixos embrionários de algodoeiro das cultivares BRS 200 e BRS 201 sobre sua regeneração, comprimento de plântulas e número de raízes emitidas, encontra-se na Tabela 3 e nas Figuras 4, 5 e 6. Observa-se que eixos embrionários de ambas as cultivares



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

**Tabela 3.** Valores médios de regeneração, comprimento de plântulas e número de raízes emitidas de eixos embrionários de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) submetidos à dessecação e ao armazenamento em nitrogênio líquido (-196 °C)

PA* dias	Tempo de dessecação (min)							
	0		30		60		90	
	BRS 200	BRS 201	BRS 200	BRS 201	BRS 200	BRS 201	BRS 200	BRS 201
	Regeneração (%)							
0	92,5	95	85	100	90	100	90	97,5
5	0	0	55	75	85	90	85	95,0
30	0	0	75	75	80	100	80	72,5
60	0	0	45	70	80	87,5	80	92,5
	Comprimento de plântulas (cm) <sup>1</sup>							
0	3,39	2,75	3,37	2,73	3,52	2,53	3,32	2,47
5	1	1	1,96	2,32	3,33	2,46	3,32	2,85
30	1	1	2,08	2,10	3,87	2,76	3,45	2,80
60	1	1	2,32	2,08	3,60	2,85	3,30	2,85
	Número de raízes							
0	36,66	25,05	44,07	27,23	49,03	25,65	37,00	20,58
5	0	0	6,20	8,17	36,97	20,19	37,74	28,53
30	0	0	18,34	8,03	37,04	16,55	31,82	21,96
60	0	0	21,52	7,29	35,63	19,15	34,15	21,72

<sup>1</sup> Valores transformados em  $(X + 1)^{1/2}$

\* PA - Período de armazenamento

quando não submetidos à dessecação, não resistiram ao armazenamento criogênico, condições em que não apresentaram qualquer manifestação de atividade metabólica.

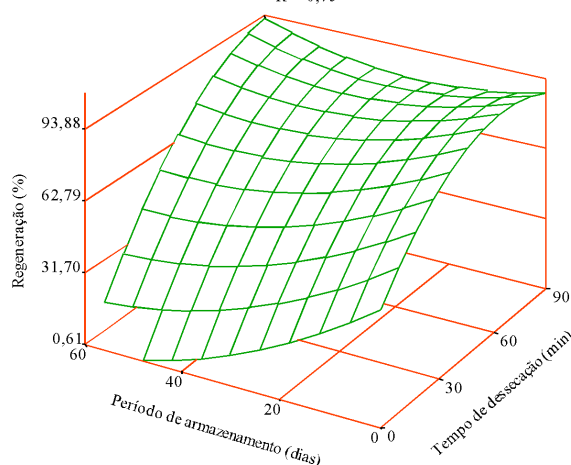
O teor de água dos eixos embrionários das duas cultivares, que se encontrava em torno de 53%, foi o fator limitante para tal comportamento (Figura 1) evidenciando a necessidade da realização da dessecação dos eixos embrionário para teores de umidade que permitam sua criopreservação. Os dados apresentados vão de encontro àqueles obtidos por Almeida et al. (2000) e Cavalcanti-Mata et al. (2004) em que criopreservaram, com sucesso, sementes de diversas leguminosas e algodão arbóreo, respectivamente, que continham em média o teor de água entre 6-7% (b.u.).

A dessecação dos eixos embrionários por pelo menos 30 min em câmara de fluxo laminar garante regeneração na ordem de 45 e 70%, para as cultivares BRS 200 e BRS 201, respectivamente,

A.

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

$$R^2 = 0,75$$



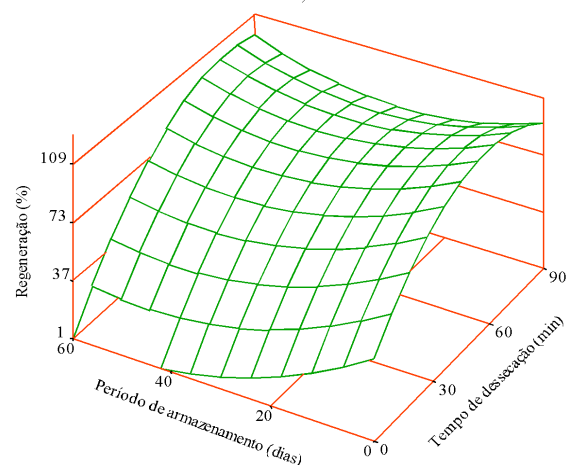
após permanência de 60 dias em imersão no nitrogênio líquido (Tabela 3 e Figuras 4A e 4B); no entanto, o ótimo de regeneração só foi obtido quando os eixos embrionários foram dessecados por no mínimo 60 min, garantindo regeneração superior a 80%, para as duas cultivares, durante todo o período de armazenamento (Tabela 3 e Figuras 4A e 4B); nessas condições os eixos embrionários continham teor de água em torno de 16%, para as cultivares estudadas (Figura 1). Resultados semelhantes foram obtidos para embriões de *Gossypium hirsutum*, cvs. CNPA 4M, CNPA5M, CNPA Precoce 1, CNPA Precoce 2 e Coker 312 (González-Benito et al., 1998).

O comprimento de plântulas de algodoeiro da cultivar BRS 201, originadas de eixos embrionários submetidos a dessecação e criopreservação, apesar de apresentar, no geral, menores valores, quando comparada com a cultivar BRS 200 (Tabela 1) demonstrou maior uniformidade nos seus valores, ao longo

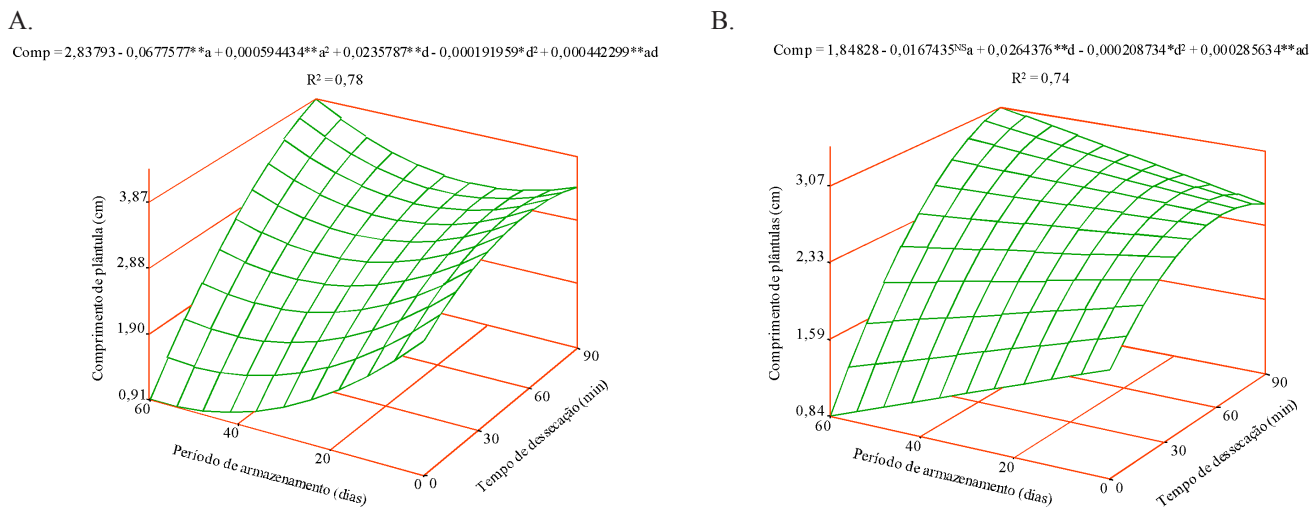
B.

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

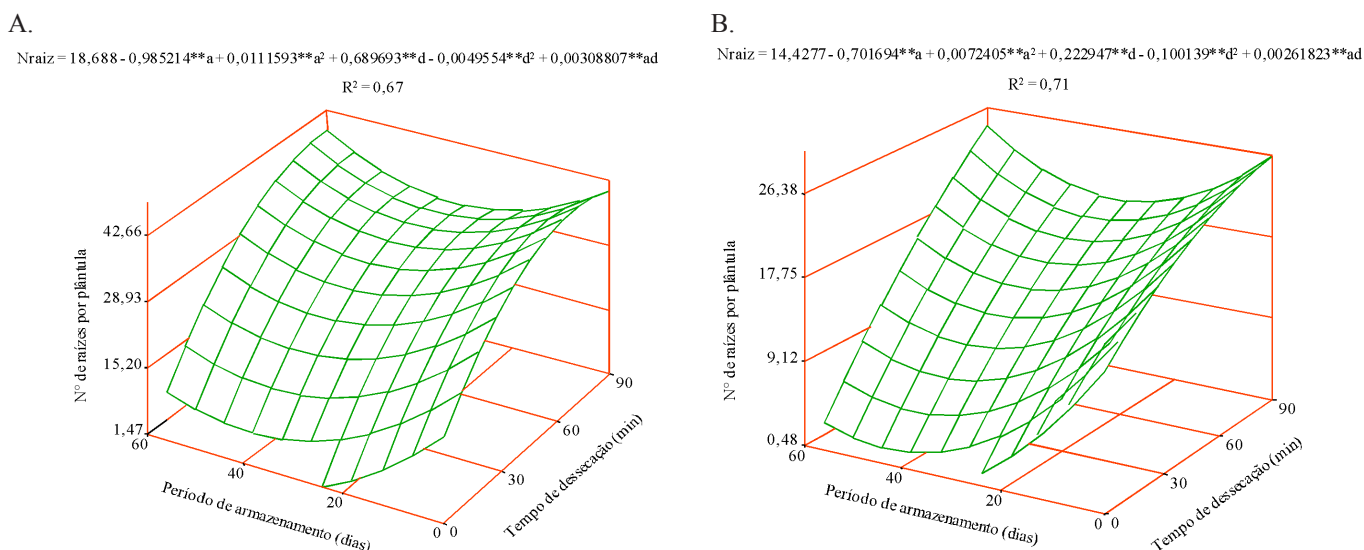
$$R^2 = 0,77$$



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



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



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

do armazenamento, independente do tempo em que os eixos embrionários permaneceram sob dessecação na câmara de fluxo laminar (Tabela 3 e Figura 5B) enquanto os eixos embrionários da cultivar BRS 200 parecem ter sofrido mais a influência do armazenamento em nitrogênio líquido, em função do tempo de dessecação, principalmente quando dessecados durante apenas 30 min (Tabela 3 e Figura 5A). A perda de viabilidade durante a criopreservação dos eixos embrionários pode ser causada devido a danos físicos sofridos pelas estruturas durante o congelamento e/ou descongelamento; sendo, portanto, de grande importância a avaliação das velocidades adequadas dos referidos processos para garantir a integridade do material quando exposto ao nitrogênio líquido. Esses relatos encontram apoio em Almeida et al. (2000). Em referência ao abordado Stanwood & Bass (1981) sugerem que o congelamento rápido tende a promover um resfriamento mais uniforme da água subcelular e o descongelamento lento evita danos nos tecidos

e células da semente. Em contraste, Dumet & Benson (2000) propõem que o congelamento rápido resulta em formação de cristais de gelo intracelulares, o que é letal para as células e os tecidos das sementes.

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

Ante os resultados obtidos, observa-se que processo de dessecação dos eixos embrionários em câmara de fluxo laminar foi de primordial importância para a sobrevivência dos mesmos às condições de temperatura ultra baixa, como a

ocorrida no nitrogênio líquido, coincidindo com os resultados obtidos com outros trabalhos (González-Benito et al., 1998; Santos et al., 2002) o que indica que a criopreservação pode ser um método adequado para a preservação de eixos embrionários da espécie. Não obstante, antes de generalizar sua utilização, deve-se avaliar sistematicamente, nas diferentes espécies e cultivares, o efeito exercido sobre a integridade física e genética do material criopreservado e o posterior desenvolvimento da planta.

A conservação da biodiversidade vegetal é um objetivo essencial para garantir a solução de problemas que poderão surgir futuramente na agricultura. Até o momento, os bancos de germoplasma são de essencial importância no alcance de tal objetivo; contudo, diante das dificuldades e problemas encontrados novas tecnologias devem ser avaliadas para otimizar seu funcionamento, o que reforça o estudo da criopreservação de espécies vegetais como forma de garantir a preservação de seus recursos genéticos. O tema abordado encontra apoio nos relatos de Almeida et al. (2000) e Usman & Abdulmalik (2010).

### CONCLUSÕES

1. O teor de água limite recomendado para criopreservação de eixos embrionários de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) está entre 9 e 16%.
2. Eixos embrionários criopreservados com 16% (b.u.) do teor de água, apresentam regeneração de plântulas in vitro de 80% (BRS 200) e 98% (BRS 201).
3. Eixos embrionários de algodoeiro com umidade em torno de 9,7% podem regenerar mais de 80% de plântulas in vitro, após 60 dias de armazenamento em nitrogênio líquido (-196 °C).

### LITERATURA CITADA

- Almeida, F. de A. C.; Cavalcanti-Mata, M. E. R. M. Conservação dos recursos fitogenéticos da região semi-árida através da criopreservação. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba, 1997. 37p. Projeto de Pesquisa
- Almeida, F. de A. C.; Jerônimo, E. S.; Alves, N. M. C.; Gomes, J. P.; Silva, A. S. Estudo de técnicas para o armazenamento de cinco oleaginosas em condições ambientais e criogênicas. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.12, p.189-202, 2010.
- Almeida, F. de A. C.; Morais, A. M. de; Carvalho, J. M. F. C.; Gouveia, J. P. G. de. Criopreservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.6, p.295-302, 2002.
- Almeida, F. de A. C.; Villamil, J. M. P.; Gouveia, J. P. G. de. Efecto de la criopreservación sobre la germinación de semillas de leguminosas. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.2, p.67-71, 2000.
- Al Zoubi, O. M.; Normah, M. N. Desiccation sensitivity and cryopreservation of excised embryonic axes of *Citrus suhuiensis* cv. Limau madu, citrumelo [*Citrus paradise* macf. x *Poncirus trifoliata* (L.) raf.] and *Fortunella polyandra*. *Cryo Letters*, v.33, p.241-251, 2012.
- Berjak, P.; Walker, M.; Mycock, D. J.; Wesley-Smith, J.; Watt, P.; Pammenter, N. W. Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos. In: Engelmann, F.; Takagi, H. (ed.). *Cryopreservation of tropical plant germplasm: Current research progress and application*. Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Japan/International. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p.140-155.
- Carlo, A.; Lambardi, M. Cryopreservation of citrus germplasm. *The Role of Biotechnology*, v.5, p.169-170, 2005.
- Cavalcanti-Mata, M. E. R. M.; Diniz, P. S. C.; Braga, M. E. D. Criopreservação de sementes de milho (*Zea mays* L.). *Revista Brasileira de Armazenamento*, v.27, p.23-30, 2002.
- Cavalcanti-Mata, M. E. R. M.; Rocha, M. do S.; Duarte, M. E. M. Teor de água limite para a criopreservação de sementes de algodão arbóreo variedade 6M. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.6, p.179-189, 2004.
- Coelho, R. R. P. Protocolo de criopreservação de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L. raça Latifolium Hutch) cultivares BRS 200 marrom e BRS verde. Areia: Universidade Federal da Paraíba, 2006. 89p. Tese Doutorado
- 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. (ed.). *Cryopreservation of tropical plant germplasm: Current research progress and application*. Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Science, International Plant Genetic Resources Institute, Rome: JIRCAS/IPGRI. 2000. p.43-56.
- Eira, T. S. M.; Reis, R. B. R. Recursos genéticos e biotecnologia-Banco de sementes de café em criopreservação: Experiência inédita no Brasil. <[http://www.giacometti.org.br/html/artigo\\_lista.cfm](http://www.giacometti.org.br/html/artigo_lista.cfm)> 13 Set 2004.
- Goldfarb, M.; Duarte, M. E. M.; Cavalcanti-Mata, M. E. R. M. Armazenamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae. *Biotemas*, v.23, p.27-33, 2010.
- González-Benito, M. E.; Carvalho, J. M. F. C.; Pérez, C. Effect of desiccation and cryopreservation of embryonic axes and seeds of cotton. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.33, p.17-20, 1998.
- ISTA - International Seed Testing Association. Informar o assunto. *Seed Science and Technology*, v.13, p.299-355, 1985.
- Kumria, R.; Leelavathi, S.; Bhatnaar, R. K.; Reddy, V. S. Regeneration and genetic transformation of cotton: present status and future perspectives. *Plant Tissue Culture*, v.13, p.211-225, 2003.
- Martinková, Z.; Honek, A. The effect of cryopreservation on germination of dandelion seeds. *Plant Protection Science*, v.43, p.63-67, 2007.
- Meletti, L. M. M.; Barbosa, W.; Veiga, R. F. A.; Pior, R. Criopreservação de sementes de seis acessos de maracujazeiro. *Revista Ciencia Agrária Paranaensis*, v.6, p.13-20, 2007.
- Murashige, T.; Skoog, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.

- Rocha, M. do S. Crioconservação e cultivo *in vitro* de sementes de algodão colorido. Campina Grande: UFCG, 2004. 112p. Dissertação Mestrado
- Rocha, M. do S.; Cavalcanti-Mata, M. E. R. M.; Carvalho, J. M. F. C.; Lopes, K. P. Crioconservação de sementes de algodão. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.13, p.312-318, 2009.
- Santos, I. R. I.; Salomão, A. N.; Mundim, R. C.; Ribeiro, F. N. S. Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de café (*Coffea arabica* L.). Brasília: Embrapa CENARGEN, 2002. 4p. Comunicado Técnico, 69
- Sharma, S. D. Cryopreservation of somatic embryos – An overview. *Indian Journal of Biotechnology*, v.4, p.47-55, 2005.
- Slageren, V. M. W. The millennium seed bank: Building partnerships in arid regions for the conservation of wild species. *Journal of Arid Environment*, v.54, p.195-201, 2003.
- Stanwood, P. C.; Bass, L. N. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. *Seed Science and Technology*, v.9, p.423-437, 1981.
- Toribio, M.; Celestino, C. El uso de la biotecnología en la conservación de recursos genéticos forestales. *Investigación Agraria*, n.2, p.249-259, 2000.
- Tresena, N. L.; Cavalcanti-Mata, M. E. R. M.; Duarte, M. E. M.; Moraes, A. M. de; Dias, V. S. Qualidade fisiológica da semente de ipê rosa (*Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo) submetidas à crioconservação. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.11, p.87-93, 2009.
- Usman, I. S.; Abdulmalik, M. M. Cryopreservation of embryonic axes of maize (*Zea mays* L.) by vitrification protocol. *African Journal of Biotechnology*, v.9, p.8955-8957, 2010.
- Veiga, R. F. R.; Meletti, L. M. M.; Barbosa, W.; Tombolato, A. F. C. A crioconservação de sementes de recursos genéticos hortícolas no Instituto Agrônômico. *O Agrônômico*, v.5, p.19-21, 2006.
- Wetzel, M. M. V. S.; Silva, D. B.; Goedert, C. O.; Pereira Neto, L. G. P. Conservação de germoplasma-semente a longo prazo no Brasil. *Magistra*, v.19, p.393-398, 2007.