



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL/PR
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA E
DESENVOLVIMENTO RURAL SUSTENTÁVEL – PPGADRS
MESTRADO EM AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL
SUSTENTÁVEL

TIAGO SCOLARI

ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE
SEMENTES DE *Araucaria angustifolia* (Bertol) O. Kuntze

LARANJEIRAS DO SUL

2017

TIAGO SCOLARI

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE
SEMENTES DE *Araucaria angustifolia* (Bertol) O. Kuntze**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável - PPGADRS da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável.

Orientador: Prof. Dr. Lisandro Tomas da Silva Bonome

LARANJEIRAS DO SUL

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

Campus Laranjeiras do Sul
BR 158, KM 405
CEP: 85.301 - 970
Caixa Postal 106
Laranjeiras do Sul – PR
Brasil

PROGRAD/DBIB - Divisão de Bibliotecas

SCOLARI, TIAGO
ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE
SEMENTES DE *Araucaria angustifolia* (Bertol) O. Kuntze/
TIAGO SCOLARI. -- 2017.
85 f.:il.

Orientador: LISANDRO TOMAS DA SILVA BONOME.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Agroecologia
e Desenvolvimento Rural Sustentável (PPGADR),
Laranjeiras do Sul, PR, 2017.

1. PINHEIRO. 2. CRIOPROTEÇÃO. 3. PVS2. 4.
CONGELAMENTO. 5. NITROGÊNIO LÍQUIDO. I. BONOME, LISANDRO
TOMAS DA SILVA, orient. II. Universidade Federal da
Fronteira Sul. III. Título.

TIAGO SCOLARI

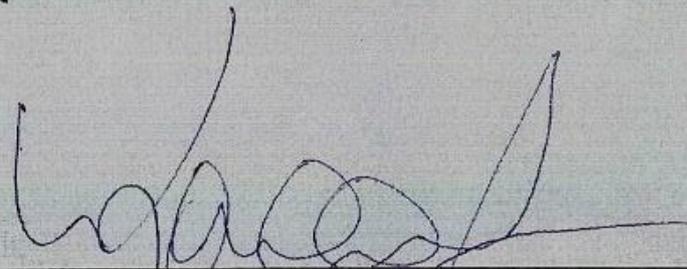
TÍTULO: "ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE *Araucaria angustifolia* (Bertol) O. Kuntze".

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável – PPGADR da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS para obtenção do título de Mestre em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável, defendido em banca examinadora em 03/03/2017

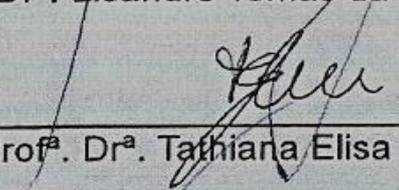
Orientador (a): Profº. Drº. Lisandro Tomas da Silva Bonome

Aprovado em: 03 / 03 / 2017

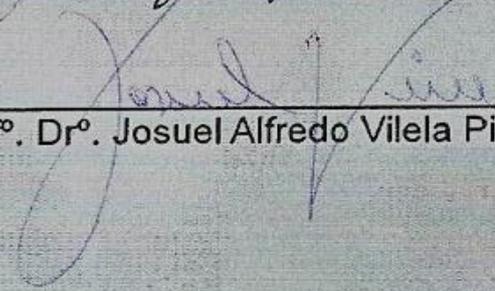
BANCA EXAMINADORA



Profº. Drº. Lisandro Tomas da Silva Bonome (UFFS)



Prof. Dr.ª Tathiana Elisa Masetto (UFGD)



Profº. Drº. Josuel Alfredo Vilela Pinto (UFFS)

Laranjeiras do Sul/PR, março de 2017

Aos meus pais Telmo Scolari (*in memoriam*),
Clemilda Felippi Scolari e a minha irmã
Cleriana Scolari.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao “Patrão Velho” por iluminar meu caminho, dar-me saúde, sabedoria, fé e forças para sempre seguir em frente.

Aos meus pais Telmo (*in memoriam*) e Clemailda, e minha irmã Cleriana pelo amor incondicional, pelo apoio nas minhas vitórias e nas minhas incertezas.

À Jaqueline de Oliveira pelo amor, pelo incentivo, pelas ajudas e por se alegrar com minhas conquistas.

Ao professor Dr. Lisandro Tomas da Silva Bonome, não só pela orientação, ensinamentos e conselhos, mas por ser uma inspiração, por acreditar no meu trabalho, por me dar forças em momentos difíceis, pelo carinho e amizade dedicados.

Ao professor Dr. Henrique von Hertwig Bittencourt, a professora Dr^a Adriana Saccol Pereira, e o professor Dr. Diego dos Santos, pelas palavras de incentivo em meus momentos de fraqueza e desânimo.

Aos colegas do laboratório de Fisiologia Vegetal.

Aos meus amigos e família de moradia que conviveram comigo durante este período do curso Jeferson Cesar Smolark e Douglas de Quevedo, pelo companheirismo e ajuda.

A Universidade Federal da Fronteira Sul e ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável, pela oportunidade e aprendizado.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

E por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer a todos que duvidaram e torceram para meu fracasso, serviram de inspiração e motivação para prosseguir e ter êxito em meu objetivo.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez. ” (George Bernard Shaw)

RESUMO

A *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze é uma das espécies nativas da região Sul do Brasil de maior importância econômica e ecológica. Nas últimas décadas devido aos grandes desmatamentos ocorridos para comercialização da madeira e para expansão da área agrícola, esta espécie entrou para a lista daquelas ameaçadas de extinção. Uma das maneiras de se preservar a *A. angustifolia* é a conservação da semente pois é a principal forma de propagação da espécie. No entanto, as sementes de *A. angustifolia* apresentam comportamento recalcitrante, o que dificulta a sua conservação por longos períodos, em virtude de não tolerarem a dessecação e temperaturas baixas. Por este motivo é necessário pesquisar outras alternativas para a conservação de sementes de *A. angustifolia* e uma das técnicas que merecem destaque é a criopreservação, que consiste em armazenar o material vegetal em nitrogênio líquido a -196°C . Entretanto, para se obter sucesso com esta técnica há uma série de condições que devem ser satisfeitas, como a redução da umidade das sementes e a formação de um estado vítreo que minimize a possibilidade de formação de cristais de gelo na célula. Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi estabelecer um protocolo de criopreservação para sementes de *A. angustifolia*, visando a manutenção de sua qualidade fisiológica por longos períodos de tempo. A pesquisa foi dividida em oito experimentos, onde se testou diferentes formas e períodos de desidratação, diferentes soluções para a crioproteção e distintas formas de congelamento das sementes. Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado. Para avaliação da qualidade fisiológica das sementes foram realizados os testes de tetrazólio, emergência de plântulas, índice de velocidade de protrusão radicular (IVP) e determinação do grau de umidade. Pelos resultados foi possível concluir que: houve redução progressiva do grau de umidade e da viabilidade das sementes de *A. angustifolia* com o aumento do período de imersão em solução de PVS2. A desidratação em sílica gel por 120 horas reduziu a viabilidade das sementes, porém o crioprotetor, glicose (60%) + glicerol (15%), quando utilizado por 72 horas, não prejudicou a qualidade fisiológica das sementes. A criopreservação em nitrogênio líquido e o congelamento em ultrafreezer independentemente do pré-tratamento utilizado foram letais as sementes de *A. angustifolia*. A aclimação das sementes de *A. angustifolia* por 24 horas em solução de 3 molar (M) de sacarose mais 12 horas em solução com 2M de glicose + 0,4M de sacarose previamente a imersão em PVS2 por 24 horas reduziu a viabilidade e o vigor. O congelamento das sementes de *A. angustifolia*, crioprotegidas com glicose (60%) + glicerol (15%), a -5°C e -18°C por 7 dias foi letal. A aclimação das sementes de *A. angustifolia* por 15 horas em solução de 0,3M de sacarose, mais 8 horas em solução com 2M de glicose + 0,4M de sacarose previamente a imersão de 12 horas em PVS2 reduziu a viabilidade e o vigor. O congelamento das sementes de *A. angustifolia*, aclimatadas e crioprotegidas com PVS2, a -5°C e -18°C por 7 dias foi letal. Com essa sequência de experimentos não foi possível estabelecer um protocolo eficiente de criopreservação para as sementes de *A. angustifolia*.

Palavras-chave: Pinheiro. Crioproteção. PVS2. Congelamento. Nitrogênio líquido.

ABSTRACT

Araucaria angustifolia (Bertol.) O. Kuntze is one of the native species from southern Brazil with economic and ecological importance. In recent decades, due to deforestation for timber marketing and expansion of agriculture, this species joined the list of those threatened with extinction. One of the ways to preserve *A. angustifolia* is per seed conservation, as it is the main process for the species propagation. However, the seeds of *A. angustifolia* endue recalcitrant behavior, not tolerating desiccation and low temperatures for long time. For this reason, it is necessary to look at alternatives for the conservation of the *A. angustifolia* seeds. One of the techniques that might be useful is cryopreservation, which consists in storing the propagules in liquid nitrogen at -196°C . However, several conditions must be met to achieve success, such as reducing the moisture of the seed to assure the formation of a vitreous state that minimizes the possibility of the generation of ice crystals in the seed cells. Due to this obstacle, the objective of this work was to establish a protocol for cryopreservation of *A. angustifolia* seeds, targeting for the maintenance of the physiological quality for prolonged periods. The research was divided into eight experiments, where forms and periods of dehydration, solutions for cryoprotection and forms of freezing of the seeds were tested. The experiments were arranged in a completely randomized design. Tetrazolium tests were performed to evaluate the physiological quality of the seeds, in addition of measuring the variables seedling emergence, root protrusion and the seed moisture content. The results lead to the following conclusions: there was a progressive reduction of seed moisture content and viability with increasing period of immersion in PVS2 solution. Dehydration in silica gel for 120 hours reduced seed viability, but when glucose (60%) + glycerol (15%) was used for 72 hours, the physiological quality of seeds was maintained. The cryopreservation in liquid nitrogen or ultrafreezer, regardless of pre-treatment used, was lethal to seeds. The acclimatization of the seeds of *A. angustifolia* for 24 hours in a 3 molar (M) sucrose solution plus 12 hours in solution with 2M glucose + 0.4M sucrose prior to immersion in PVS2 for 24 hours, reduced viability and seed vigour. The freezing of *A. angustifolia* seeds, using cryoprotectants with glucose (60%) + glycerol (15%), at -5°C and -18°C for 7 days, were lethal. The acclimatization of the seeds for 15 hours in a 0.3M solution of sucrose plus 8 hours in a 2M glucose + 0, 4M sucrose solution prior to immersion of 12 hours in PVS2 reduced seed viability and vigour. Freezing of acclimated seeds cryoprotected with PVS2, at -5°C and -18°C for 7 days, was lethal. The results of these experiments not allowed to establish an efficient protocol for cryopreservation of *A. angustifolia* seeds.

Keywords: Pine. Crioprotection. PVS2. Freezing. Liquid nitrogen.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura reprodutiva masculina e feminina da <i>A angustifolia</i>	22
FIGURA 2 – Semente de <i>Araucaria angustifolia</i>	23
FIGURA 3 – Esquema de execução do experimento I.....	34
FIGURA 4 – Esquema de execução do experimento II.....	37
FIGURA 5 – Esquema de execução do experimento III.....	38
FIGURA 6 – Esquema de execução do experimento IV.....	40
FIGURA 7 – Esquema de execução do experimento V.....	42
FIGURA 8 – Esquema de execução do experimento VI.....	44
FIGURA 9 – Esquema de execução do experimento VII.....	46
FIGURA 10 – Esquema de execução do experimento VIII.....	48

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Redução da temperatura do ultrafreezer durante o período de congelamento.	34
GRÁFICO 2 – Grau de umidade, tetrazólio, emergência de plântulas e índice de velocidade de protrusão radicular de sementes de <i>A. angustifolia</i> criopreservadas em nitrogênio líquido e congeladas em ultrafreezer.	50
GRÁFICO 3 – Umidade e viabilidade de sementes de <i>A. angustifolia</i> imersas em PVS2 por diferentes períodos de tempo.	54
GRÁFICO 4 – Umidade e viabilidade de sementes de <i>A. angustifolia</i> submetidas a desidratação em sílica gel e imersas por diferentes períodos de tempo em crioprotetor de glicose 60% + glicerol 15%.	58
GRÁFICO 5 – Umidade, tetrazólio, emergência de plântulas e IVP de sementes de <i>A. angustifolia</i> imersas em PVS2 e posteriormente congeladas em ultrafreezer e criopreservadas em nitrogênio líquido.	62
GRÁFICO 6 - Umidade, tetrazólio, emergência de plântulas e IVP de sementes <i>A. angustifolia</i> submetidas a sílica gel e imersas em solução glicose 60% + glicerol 15%, posteriormente congeladas em ultrafreezer e criopreservadas em nitrogênio líquido.	66
GRÁFICO 7 - Umidade, tetrazólio, emergência de plântulas e IVP de sementes de <i>A. angustifolia</i> imersas em crioprotetores e posteriormente criopreservadas em nitrogênio líquido com e sem solução de PVS2.	71
GRÁFICO 8 - Umidade, emergência de plântulas e IVP de sementes de <i>A. angustifolia</i> imersas em crioprotetores e posteriormente congeladas nas temperaturas de -5 e -18°C por 7 dias.	74
GRÁFICO 9 - Umidade, emergência de plântulas e IVP de sementes de <i>A. angustifolia</i> imersas em PVS2 e posteriormente congeladas nas temperaturas de -5 e -18°C por 7 dias.	76

LISTA DE IMAGENS

IMAGEM 1 – Determinação do grau de umidade.	35
IMAGEM 2 – Demonstração do experimento VI.	44
IMAGEM 3 - Danos causados após criopreservação em nitrogênio líquido.	51
IMAGEM 4 – Coloração em sal de tetrazólio de embriões de sementes de <i>A. angustifolia</i> criopreservados em nitrogênio líquido e congelados em ultrafreezer.	53
IMAGEM 5 – Coloração em sal de tetrazólio de embriões de sementes de <i>A. angustifolia</i> imersos em solução de PVS2 por diferentes períodos de tempo.	55
IMAGEM 6 – Coloração em sal de tetrazólio de embriões de sementes de <i>A. angustifolia</i> desidratados em sílica gel e imersos em crioprotetor de glicose 60% + glicerol 15% por diferentes períodos de tempo, depois criopreservados em nitrogênio líquido.	59
IMAGEM 7 - Danos causados por <i>Cydia araucariaceae</i> na amêndoa e no embrião de <i>A. angustifolia</i>	60
IMAGEM 8 – Coloração em sal de tetrazólio de embriões de sementes de <i>A. angustifolia</i> imersos em PVS2 e depois criopreservados em nitrogênio líquido e congelados em ultrafreezer.	63
IMAGEM 9 – Emergência de plântulas de <i>A. angustifolia</i> após 48 horas de imersão em PVS2 e criopreservação em nitrogênio líquido.	64
IMAGEM 10 – Coloração em sal de tetrazólio de embriões de sementes de <i>A. angustifolia</i> desidratados e crioprotetidos em sílica gel + solução de glicerol 15% e glicose 60% e depois criopreservados em nitrogênio líquido e congelados em ultrafreezer.	68
IMAGEM 11 – Amêndoas de <i>A. angustifolia</i> em sílica gel.	70
IMAGEM 12 – Coloração em sal de tetrazólio de embriões de sementes <i>A. angustifolia</i> crioprotetidos e posteriormente criopreservados em nitrogênio líquido com e sem solução de PVS2.	72

LISTA DE ABREVIATURAS

- A. angustifolia* – *Araucaria angustifolia*
A. araucana – *Araucaria araucana*
A. brasiliana – *Araucaria brasiliana*
A. colubrina – *Anadenanthera colubrina*
A. hunsteinii – *Araucaria hunsteinii*
B. salicifolius – *Blepharocalyx salicifolius*
C. araucariaceae – *Cydia araucariaceae*
C. decandra – *Casearia decandra*
H. glaucescens – *Hippeastrum glaucescens*

LISTA DE SIGLAS

% – Porcentagem

°C – Graus Celsius

AC – Atmosfera controlada

AM – Atmosfera modificada

BAG – Banco Ativo de Germoplasma

Bert – Bertoloni

CEAGESP – Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo

CEASAs – Centrais de Abastecimentos

cm – centímetro

CO₂ – Gás Carbônico

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – deoxyribonucleic acid

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FOM – Floresta Ombrófila Mista

GG – Glicose (60%) mais Glicerol (15%)

IUCN – International Union for Conservation of Nature and Natural Resources

IVP – Índice de velocidade de protrusão radicular

LEAs – Late Embryogenic Abundant

Mpa – Mega pascal

NL – Nitrogênio líquido

O. Kuntze – Otto Kuntze

O₂ – Oxigênio

Pol Hg – Polegadas de mercúrio

PVS – *Plant Vitrification Solution*

Rich – Richard

ROS – espécies reativas de oxigênio

SG – Sílica gel

UR – Umidade relativa

UTF – Ultrafreezer

v/v – volume/volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 A ARAUCÁRIA	19
2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS SEMENTES DE ARAUCÁRIA	21
2.3 SEMENTES RECALCITRANTES	23
2.4 CRIOPRESERVAÇÃO	25
2.4.1 Crioproteção e Vitriificação.....	26
2.4.2 Congelamento lento e rápido	28
2.4.3 Descongeloamento	29
2.5 BANCO DE GERMOPLASMA	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO DAS SEMENTES	33
3.2 EXPERIMENTO I – CONGELAMENTO EM ULTRAFREEZER E CRIOPRESERVAÇÃO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA.	33
3.2.1 Determinação do grau de umidade	35
3.2.2 Teste de tetrazólio	35
3.2.3 Teste de emergência de plântulas.....	36
3.2.4 Índice de velocidade de protrusão radicular (IVP)	36
3.2.5 Delineamento experimental e análise estatística para o experimento I.....	36
3.3 EXPERIMENTO II – REDUÇÃO DO GRAU DE UMIDADE E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS SEMENTES DE ARAUCÁRIA TRATADOS COM PVS2 POR DIFERENTES PERÍODOS DE TEMPOS.	37
3.3.1 Determinação do grau de umidade	37
3.3.2 Teste de tetrazólio.....	37
3.3.3 Delineamento experimental e análise estatística para o experimento II	37
3.4 EXPERIMENTO III – VIABILIDADE DAS SEMENTES DE ARAUCÁRIA DESIDRATADAS EM SÍLICA GEL E CRIOPROTEGIDAS EM SOLUÇÃO DE GLICEROL + GLICOSE POR DIFERENTES PERÍODOS DE TEMPO	38
3.4.1 Determinação do grau de umidade	39
3.4.2 Teste de tetrazólio.....	39

3.4.3 Delineamento experimental e análise estatística para o experimento III.....	39
3.5 EXPERIMENTO IV – CRIOPROTEÇÃO DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA EM PVS2 COM POSTERIOR CRIOPRESERVAÇÃO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO E CONGELAMENTO EM ULTRAFREEZER.	39
3.5.1 Determinação do grau de umidade	40
3.5.2 Teste de tetrazólio.....	40
3.5.3 Teste de emergência de plântulas.....	40
3.5.4 Índice de velocidade de protrusão radicular (IVP)	40
3.5.5 Delineamento experimental e análise estatística para o experimento IV	40
3.6 EXPERIMENTO V – CRIOPRESERVAÇÃO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO E CONGELAMENTO EM ULTRAFREEZER DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA DESIDRATADAS COM SÍLICA GEL E CRIOPROTEGIDAS EM GLICEROL + GLICOSE	41
3.6.1 Determinação do grau de umidade	42
3.6.2 Teste de tetrazólio.....	42
3.6.3 Teste de emergência de plântulas.....	42
3.6.4 Índice de velocidade de protrusão radicular (IVP)	42
3.6.5 Delineamento experimental e análise estatística para o experimento V.....	43
3.7 EXPERIMENTO VI – CRIOPRESERVAÇÃO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO E CONGELAMENTO EM ULTRAFREEZER DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA PRÉ ACLIMATADAS E CRIOPROTEGIDAS EM PVS2.....	43
3.7.1 Determinação do grau de umidade	45
3.7.2 Teste de tetrazólio.....	45
3.7.3 Teste de emergência de plântulas.....	45
3.7.4 Índice de velocidade de protrusão radicular (IVP)	45
3.7.5 Delineamento experimental e análise estatística para o experimento VI.....	45
3.8 EXPERIMENTO VII – CONGELAMENTO DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA DESIDRATADAS E CRIOPROTEGIDAS COM GLICOSE 60% + GLICEROL 15%.....	45
3.8.1 Determinação do grau de umidade	46
3.8.2 Teste de emergência de plântulas.....	47
3.8.3 Índice de velocidade de protrusão radicular (IVP)	47
3.8.4 Delineamento experimental e análise estatística para o experimento VII	47

3.9 EXPERIMENTO VIII – ACLIMATAÇÃO, DESIDRATAÇÃO, CRIOPROTEÇÃO COM PVS2 E CONGELAMENTO DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA EM DIFERENTES TEMPERATURAS.	47
3.9.1 Determinação do grau umidade	48
3.9.2 Teste de emergência de plântulas.....	49
3.9.3 Índice de velocidade de protrusão radicular (IVP)	49
3.9.4 Delineamento experimental e análise estatística para o experimento VIII.....	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 EXPERIMENTO I.....	50
4.2 EXPERIMENTO II	54
4.3 EXPERIMENTO III.....	57
4.4 EXPERIMENTO IV.....	61
4.5 EXPERIMENTO V	65
4.6 EXPERIMENTO VI.....	70
4.7 EXPERIMENTO VII	73
4.8 EXPERIMENTO VIII	75
5 CONCLUSÕES.....	78
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

A *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze é a gimnosperma nativa de maior importância econômica e biológica do Brasil (MATTOS, 2011), sendo a principal representante da Floresta Ombrófila Mista - FOM, pertencente ao Bioma Mata Atlântica. Devido ao alto potencial madeireiro, resinífero e alimentar da espécie, esta vem sofrendo forte exploração extrativista desde o século passado, levando sua inserção na lista da International Union for Conservation of Nature and Natural Resources – IUCN, como ameaçada de extinção (FARJON, 2010). A espécie consta também na Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2014).

A semente é principal forma de propagação da espécie (GARCIA et al., 2014), portanto, uma das estratégias para preservar a *A. angustifolia* é pela conservação de sementes *ex situ*, visto que a conservação *in situ* não está sendo eficiente devido a exploração da espécie pelos humanos.

No entanto, segundo Tompsett (1984); Eira et al. (1994); Medeiros e Eira (2006), as sementes de *A. angustifolia* são recalcitrantes, ou seja, perdem a viabilidade quando o grau de umidade é reduzido a valores abaixo de 37%. Por este motivo a conservação de sementes recalcitrantes é um grande desafio, por serem sensíveis a perda de água, tais sementes necessitam de armazenagem com alto grau de umidade (SOUZA, 2014). Essa condição faz com que as sementes permaneçam com atividade metabólica intensa, como consequência disso, ocorre rápido consumo das reservas ocasionando baixa longevidade, além de estarem suscetíveis ao ataque de microrganismos e a germinação durante o armazenamento.

O comportamento recalcitrante das sementes, portanto, constitui-se em um entrave para a conservação *ex situ* (BROWN; HARDNER, 2000). A dificuldade de conservação *ex situ* das sementes recalcitrantes pelos métodos tradicionais utilizados para sementes ortodoxas tem dirigido esforços de pesquisadores na busca por métodos alternativos, dentre eles merece destaque a criopreservação, cujo método consiste em armazenagem de material vegetal em nitrogênio líquido a -196°C , ou na sua fase de vapor a -150°C . Quando o material atinge a temperatura de -140°C a atividade metabólica chega a níveis insignificantes, geralmente permitindo a conservação do material vegetal por longos períodos (FRIZZO, 2013).

Contudo, para se obter êxito com a técnica da criopreservação o material vegetal deve apresentar teores mínimos de água para evitar a formação de cristais de gelo intra e intercelular durante o congelamento, responsável pelo insucesso da técnica. Em virtude da sensibilidade à desidratação das sementes recalcitrantes, a remoção da água deve ocorrer de maneira

extremamente cuidadosa. Uma alternativa para evitar injúrias durante a desidratação é a utilização de solução concentrada de açúcares antes do congelamento, a qual pode agir como agente osmótico externo, removendo o excesso de água intracelular mediante um gradiente osmótico. Além disso, os açúcares podem atuar como protetores, substituindo a água na membrana e mantendo sua estabilidade. Todavia, a solução utilizada, a concentração e o período de imersão do material vegetal na solução é variável de espécie para espécie, estando o sucesso da criopreservação dependente destas informações.

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo de criopreservação para sementes de *A. angustifolia*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A ARAUCÁRIA

O gênero *Araucaria* é pré-histórico, pois surgiu no período Jurássico e dominou a Era Mesozóica. Atualmente existem 14 espécies de *Araucaria* spp. e apenas duas estão presentes na América do Sul: *A. angustifolia* e *A. araucana*. A primeira é a que tem maior expressão em área e já foi considerada a conífera nativa de maior expressão econômica do país (BASSO, 2010).

Pertencente à família Araucariaceae, a espécie *A. angustifolia* foi descrita por Bertoloni em 1820 como *Columbea angustifolia* Bert., posteriormente foi redescrita por Richard em 1922 como *A. brasiliana* Rich., e retificada por Otto Kuntze como *A. angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. (SOARES, 2004).

A *A. angustifolia*, também conhecida como araucária, pinho, pinheiro, pinheiro brasileiro, pinheiro-do-Paraná, cori, coiová e pinheiro-das-missões é uma espécie símbolo do Paraná e é a única espécie do gênero nativa do Brasil (LORENZI, 2008).

A distribuição da espécie no país vai desde o Oeste do Estado de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, estando as maiores áreas de concentração nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (CARVALHO, 2002). A espécie integra o Bioma da Mata Atlântica, sendo o principal componente da FOM, popularmente conhecida como Floresta de Araucária, na qual ocorre com exclusividade e cujo nome evidencia sua importância regional (DANNER et al., 2012).

A *A. angustifolia* é uma gimnosperma, possui copa alta, estratificada e múltipla, caliciforme nas árvores mais velhas e cônica nas mais jovens (CARVALHO, 2002). Trata-se de uma típica conífera brasileira, árvore grande e perenifólia, de tronco reto e quase cilíndrico, com altura variando entre 10m e 35m, fuste com até 20m e diâmetro à altura do peito acima de 50cm quando adulta (SOARES, 2004).

É uma planta dióica, isto é, há árvores femininas e masculinas, com suas respectivas inflorescências ou estróbilos. Segundo Mattos (2011), há predominância de indivíduos masculinos tanto em áreas de ocorrência natural, como em plantios. Possui um longo ciclo reprodutivo, sendo que a primeira flora pode ocorrer antes dos 15 anos de idade em planta cultivada isoladamente e antes dos 20 anos de idade nas populações naturais. A floração feminina ocorre o ano todo, a masculina, de setembro a outubro.

Apresenta usos diversificados, destacando-se a utilização de sua madeira para construções, serrarias e produção de celulose e papel, além do uso ornamental da árvore, e consumo das suas sementes (pinhões), muito apreciadas pela fauna e na culinária regional (LORENZI, 2008; MATTOS, 2011). Os galhos, refugos e o nó de pinho servem para lenha e combustível de caldeiras (MATTOS, 2011). Sua resina é utilizada na fabricação de vernizes, terebentina, acetona, ácido pirolenhoso e outros produtos químicos (GARCIA, 2012)

Danner et al. (2012) discorrem sobre a importância da espécie como alimento, pois suas sementes, os pinhões, tem elevado teor nutritivo, em função de suas reservas de amido e quantidades significativas de proteínas e lipídios. Produz anualmente cerca de 40 pinhas, chegando a atingir até 200 pinhas por planta e cada pinha apresenta em média 100 pinhões. Assim, a espécie também apresenta importância econômica, sendo comercializadas em mercados atacadistas, como a CEAGESP de São Paulo e CEASAs dos Estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná, uma quantia de 3.399 toneladas de pinhão somente em 2011, movimentando cerca de 6,23 milhões de reais apenas nestes centros de comercialização.

Seu potencial como recurso alimentício se associa à sua importância ecológica, pois serve como fonte de alimento para uma ampla diversidade da fauna associada a floresta com Araucária. Exemplos dessa fauna associada são a gralha azul (*Cyanocorax caeruleus*); papagaios e outros psitacídeos como as maitacas, maracanãs e tirivas; roedores como a cutia, ratos, ouriços, preás e pacas além de bugios e outros tipos de macacos, onde todos estes animais atuam na dispersão das sementes (BASSO, 2010).

A presença da *A. angustifolia* com seu tronco reto e sua copa característica, sobressaindo acima da altura média da floresta, imprime uma fisionomia inconfundível as Florestas com Araucária. A espécie é considerada emergente e determinante da fitofisionomia, pois ao colonizar áreas abertas ou campos, cria condições de umidade e fertilidade que facilitam a recuperação de outras espécies de plantas (SOLÓRZANO-FILHO; KRAUS 1999).

Por se tratar de uma espécie pioneira, a *A. angustifolia* funciona como uma “proteção” para o crescimento de espécies na floresta como: a canela sassafrás (*Ocotea pretiosa*), a canela-preta (*Ocotea catarinenses*) e a imbuia (*Ocotea porosa*). Outra função ecológica é a formação de húmus a partir de grimpas, galhos e troncos que secam e caem, sendo então decompostos pelos microrganismos presentes no solo e servindo de adubo para outras plantas (CARVALHO, 2002).

Em função do elevado valor econômico, madeireiro, alimentar e resinífero da *A. angustifolia*, suas populações naturais têm enfrentado uma progressiva extinção (EIRA et al., 1994) e, por isso, compõe a Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção

publicada no final de 2014 (BRASIL, 2014). Além disso, a regeneração natural da espécie é dificultada pela predação de suas sementes, pela fauna silvestre, antes e depois de sua dispersão (MATTOS, 2011).

2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS SEMENTES DE ARAUCÁRIA

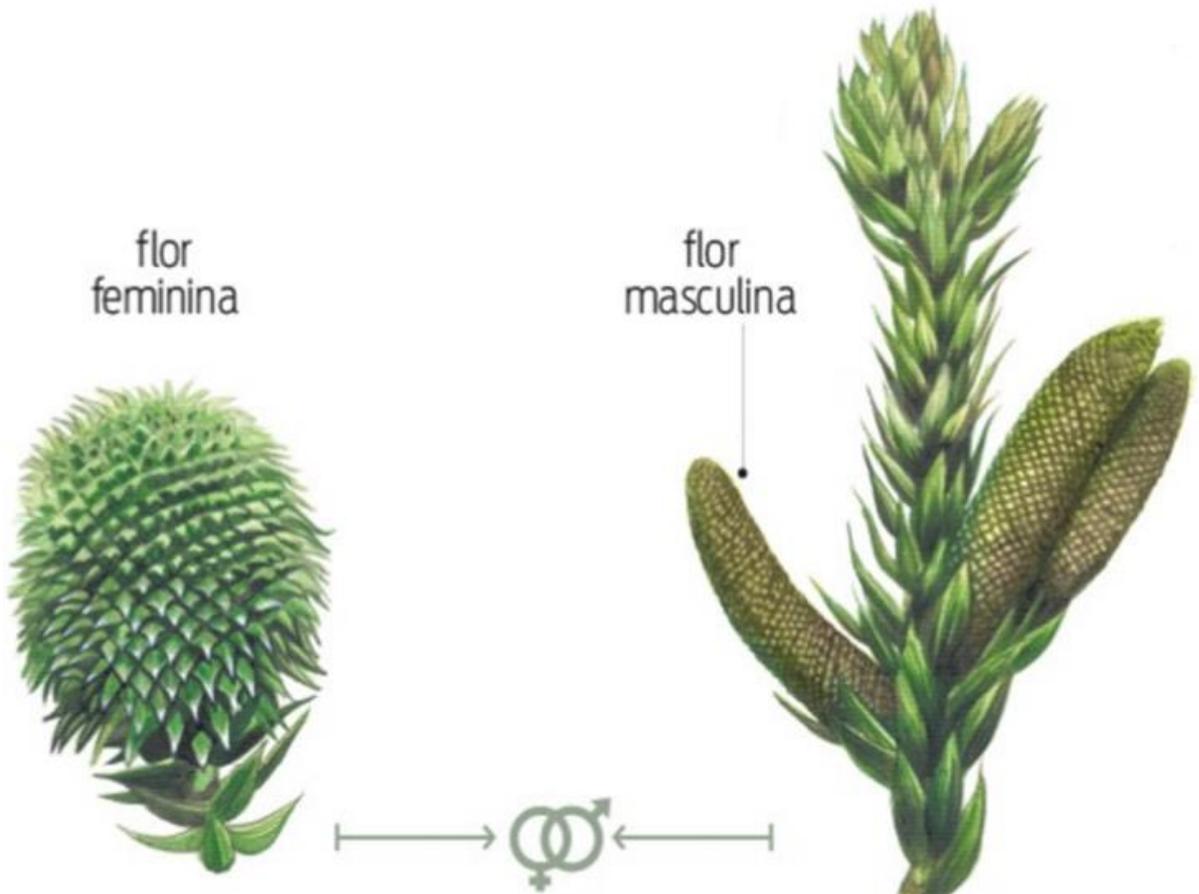
Por ser uma planta dióica, a *A. angustifolia* apresenta estruturas reprodutivas femininas e masculinas em plantas diferentes, podendo em algumas exceções raríssimas ser monóicas, tendo as duas estruturas reprodutivas na mesma planta, as inflorescências se desenvolvem na extremidade dos ramos (MATTOS, 2011).

A estrutura reprodutiva masculina é conhecida como mingote (Figura 1), são alongados com escamas e em seu interior encontram-se os sacos polínicos. São de cor verde e seu eixo longitudinal é reto no início de seu desenvolvimento, com sua maturação, geralmente em setembro e outubro, os mingotes começam a ficar com coloração amarelada até castanha e seu eixo começa a se curvar, nessa época, os grãos de pólen saem e o ciclo reprodutivo nas plantas masculinas encerra-se. Após cumprir sua missão desprende-se da planta mãe (MATTOS, 2011).

O ginostrobilo é a parte feminina da planta, conhecida como pinha. É composto por numerosas folhas carpelares (megaesporófilo) inseridas ao redor de um eixo cônico, sua forma é arredondada com coloração verde. Árvores femininas apresentam estruturas reprodutivas durante o ano todo (MATTOS, 2011).

A polinização ocorre pelo vento predominantemente em setembro e outubro quando os ginostrobilos estão abertos e os mingotes maduros (CARVALHO, 2002). O período de queda dos pinhões vai de março a agosto, cerca de 6 meses (180 dias), dependendo da região (MATTOS, 2011; SOLÓRZANO-FILHO; KRAUS, 1999).

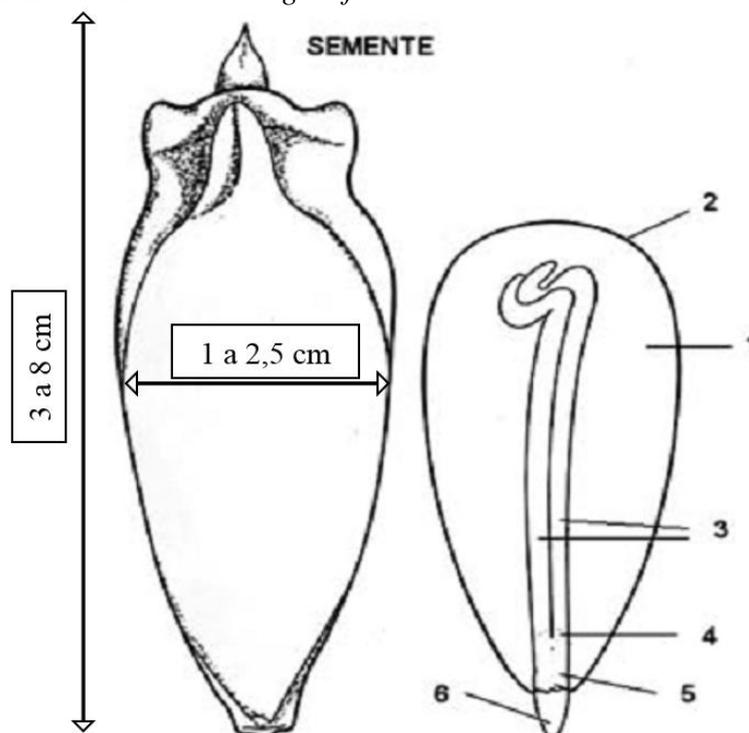
FIGURA 1 – Estrutura reprodutiva masculina e feminina da *A. angustifolia*.



Fonte: adaptado Frizzo 2013.

As sementes (pinhões), formam-se nos ginostrobilos a partir de óvulos nus, apresentando tegumento duro e endosperma abundante, o qual possui cerca de 55% de amido e alto teor de aminoácidos (CARVALHO, 2002).

O pinhão geralmente apresenta comprimento variando entre 3 e 8 cm, largura entre 1 a 2,5 cm e peso médio de 8,7 g (Figura 2). O formato da semente é obovalada-oblonga possuindo uma extremidade terminando em ápice com espinho curvado na ponta. No centro encontra-se o embrião, longo e cilíndrico, com dois grandes cotilédones, que perfazem 80% do tamanho final do embrião, sendo o restante do embrião composto pelo eixo hipocótilo-radícula (CARVALHO, 2002).

FIGURA 2 – Semente de *Araucaria angustifolia*.

1-Endosperma; 2-Tegumento; 3-Cotilédones; 4-Meristema apical; 5-Hipocotilo; 6-Radícula.
Fonte: adaptado BRASIL (2009).

2.3 SEMENTES RECALCITRANTES

Estima-se que 8% das 20.000 espécies da flora mundial sejam classificadas como recalcitrantes (ROYAL BOTANIC GARDENS KEW, 2008).

As sementes podem ser classificadas em ortodoxas ou recalcitrantes de acordo com a proposição de Roberts (1973). As sementes ortodoxas podem ser dessecadas a baixíssimos teores de água (2 a 5% em base úmida) sem sofrer danos pela dessecação. Já as sementes recalcitrantes perdem a viabilidade com a redução do grau de umidade a partir de valores próximos de 30%, denominado de “grau de umidade letal”. Um terceiro grupo de sementes com comportamento intermediário ao das ortodoxas e recalcitrantes foi proposto após a classificação de Roberts por Ellis et al., (1990), sendo que as sementes intermediárias toleram a dessecação a valores entre 10% e 13%, entretanto, são sensíveis a baixas temperaturas, sofrendo danos quando abaixo de 0 °C.

Diferenças entre sementes recalcitrantes e ortodoxas também são evidenciadas durante a sua formação, que é geralmente dividida em três etapas. Na primeira delas ocorre o crescimento inicial da semente causado pela divisão celular, aumento do peso fresco da semente e do conteúdo de água. Na segunda ocorre o aumento de tamanho da semente pela expansão

celular e acúmulo de reservas. Já na terceira etapa depois de ocorrer o ponto de maturação fisiológica a semente sofre redução no grau de umidade. A redução do grau de umidade reduz gradativamente o metabolismo da semente fazendo com que o embrião se torne quiescente. No entanto, nas sementes recalcitrantes não ocorre a redução do grau de umidade da terceira fase, elas passam diretamente para a fase germinativa e são dispersas com alto grau de umidade, por isso também há rara ocorrência de dormência nesse tipo de semente (BONJOVANI, 2011).

As sementes de *A. angustifolia*, de acordo com Garcia et al. (2014), são a principal forma de propagação da espécie. No entanto, em virtude de seu comportamento recalcitrante (TOMPSETT, 1984; EIRA et al., 1994; MEDEIROS; EIRA, 2006), a sua sobrevivência nas condições ambientais naturais é pequena. A alta umidade das sementes favorece ainda o ataque de fungos, como: *Colletotrichum sp*, *Pestalotia sp*, *Fusarium sp*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp* e *Trichoderma sp*, contribuindo para a perda de viabilidade das sementes (FONSECA; FREIRE, 2003). Lorenzi (2008), relata que os pinhões têm viabilidade de aproximadamente 120 dias em condições ambientais naturais e, após este período, a maioria perde a capacidade germinativa.

A longevidade das sementes recalcitrantes é relativamente curta e varia de alguns dias a poucos meses. Isso torna necessária a semeadura das espécies recalcitrantes o quanto antes possível, resultando em concentração de oferta de mudas em alguns períodos do ano, que podem ser desfavoráveis ao plantio das mudas (FONSECA; FREIRE, 2003). A resolução desses problemas pode ser conseguida pela armazenagem das sementes dessas espécies.

O armazenamento de sementes constitui num conjunto de técnicas e procedimentos realizados com o intuito de manter a qualidade inicial das mesmas. Estas técnicas visam minimizar a deterioração fisiológica através do controle de fatores ambientais, proporcionando um ambiente ideal para a conservação das sementes. Entre os objetivos que motivam a armazenagem de sementes estão a formação de plantios comerciais e a conservação de genes de diferentes espécies, incluindo as florestais nativas. De modo geral, as condições que proporcionam conservação da qualidade fisiológica de sementes, estão associadas a baixa luminosidade, baixas temperaturas e baixa umidade, tanto para as sementes quanto para o ambiente em que elas estão inseridas, proporcionando-as maior longevidade (FLORIANO, 2004).

A conservação de sementes recalcitrantes por meio de armazenamento é um grande desafio, pois, por serem muito sensíveis a perda de água, tais sementes necessitam de armazenagem com alto grau de umidade. Essa condição faz com que as sementes permaneçam com atividade metabólica intensa e, como consequência disso, ocorre rápido consumo das

reservas ocasionando baixa longevidade, além de estarem suscetíveis ao ataque de microrganismos e a germinação no armazenamento.

Segundo Taiz e Zeiger (2013) a temperatura determina a velocidade de reações enzimáticas de modo que também modula a taxa respiratória. Diante disso, Souza (2014) discorre que os problemas, anteriormente mencionados, relacionados a armazenagem de sementes recalcitrantes poderiam ser minimizados com uso de baixas temperaturas na armazenagem, porém as sementes de *A. angustifolia* sofrem injúrias nas condições de temperatura próxima ou abaixo de 0 °C. Fonseca e Freire (2003) explicam que sementes com alto grau de umidade quando expostas a temperaturas negativas sofrem danos causados pela formação de cristais de gelo nos tecidos e isso leva a perda da viabilidade, devido a ruptura mecânica da estrutura citoplasmática e da membrana celular causada pela expansão da água congelada.

2.4 CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação é um método de conservar material vegetal a temperaturas ultrabaixas obtidas em nitrogênio líquido (NL), tanto em sua fase de vapor, -150°C, quanto em sua fase líquida, -196°C (SANTOS, 2000).

Desse modo o material criopreservado chega a inativar a respiração e processos enzimáticos, permitindo afirmar que o metabolismo chega a praticamente parar, evitando que ocorra deterioração fisiológica significativa em função do período armazenado (TOMBLATTO et al., 2009). Assim é possível promover a conservação do material biológico por longos períodos de tempo sem comprometer a sua qualidade fisiológica e utiliza-lo quando desejado, para promover a geração de uma nova planta, desde que se mantenha o reservatório de nitrogênio abastecido (PORTO, 2013).

Goldfarb et al. (2010) explica que a criopreservação tem vantagem sobre os demais métodos de conservação de material vegetal porque abre a possibilidade de conservação por tempo indefinido.

Gonzaga et al. (2003) afirma que o método de criopreservação é o que melhor se adapta para o armazenamento de sementes ameaçadas de extinção, pois praticamente para o metabolismo das sementes, permitindo recuperá-las posteriormente.

A criopreservação pode ser feita com qualquer amostra de uma planta, no entanto, as partes vegetativas e reprodutivas mais utilizadas são segundo Santos e Salomão (2010) as

sementes, meristemas, ápices caulinares, gemas dormentes, pólen, embriões zigóticos, além de materiais *in vitro* como células em suspensão, embriões somáticos e calos.

Carvalho e Vidal (2003) enunciam como essenciais para o sucesso da criopreservação seis etapas: pré-crescimento, crioproteção, resfriamento, armazenamento, descongelamento e regeneração do material vegetal. No entanto, a primeira e a última destas se referem a criopreservação de culturas de tecido celulares.

Um grande obstáculo a ser vencido no processo de criopreservação, principalmente durante o resfriamento e descongelamento do material, é a formação de cristais de gelo. Esses cristais são provenientes da água intracelular dos tecidos vegetais, que se solidifica quando são atingidas temperaturas inferiores a -40°C , para o caso da água pura (PORTO, 2013), culminando num processo letal devido a danos mecânicos que rompem as membranas celulares e acabam por extravasar o suco celular do citoplasma (GOLDFARB, 2008).

Dois mecanismos podem promover o dano à estrutura celular e conduzir diretamente à diminuição da firmeza do tecido vegetal: o primeiro está relacionado com a possibilidade de perfuração da membrana celular pelo cristal de gelo intracelular, contribuindo para a redução da pressão de turgor, já o segundo relaciona-se com a quebra da estrutura da parede celular pelo cristal formado no meio extracelular, podendo ocorrer o colapso celular (SANTOS, 2001).

O grau de umidade pode ser o fator mais crítico para o processo de criopreservação de sementes, devendo-se reduzi-lo para evitar injúrias da formação de gelo, porém a água exerce muitas funções biológicas nas células e sua retirada também pode ser danosa (PORTO, 2013).

Garcia (2012) constatou que aos 120 dias de armazenamento, as sementes de *A angustifolia* armazenadas em refrigerador a 5°C permaneceram com percentual de germinação próximo a 59%, enquanto um decréscimo de 30 pontos percentuais na germinação foi detectado para as sementes armazenadas em temperatura ambiente (de 71 para 41%). Por outro lado, o armazenamento das sementes a -18°C determinou a perda total da viabilidade aos 60 dias de armazenamento, ou seja, o congelamento provocou a morte do embrião.

2.4.1 Crioproteção e Vitrificação

A crioproteção se refere a aplicação de uma ou mais substâncias que ajudam à célula a tolerar mudanças físicas e químicas relacionadas aos processos de congelamento e descongelamento (CARVALHO; VIDAL, 2003).

Santos e Salomão (2010) explicam que a crioproteção é feita expondo o material vegetal a soluções crioprotetoras, que têm função de diminuir o ponto de congelamento e a formação de cristais de gelo intracelular no material criopreservado. Além disso, essas substâncias são capazes de proteger o material biológico das injúrias causadas pela desidratação (CARVALHO et al., 2006).

Exemplos de substâncias crioprotetoras são: dimetilsulfóxidos (DMSO), etilenoglicol, metanol, glicerol, propileno glicol e alguns açúcares como, sacarose, trealose e glucose. Os açúcares em função do material vegetal devem ser preferidos, visto que as primeiras podem causar efeito citotóxico nas amostras criopreservadas. Os açúcares podem agir como agentes osmóticos externos, removendo o excesso de água intracelular mediante um gradiente osmótico.

A ação dos açúcares como crioprotetores ainda não é totalmente conhecida, existem duas hipóteses que tentam explica-la. A primeira seria da ação destes como agentes osmóticos externos que removem o excesso de água intracelular por fluxo osmótico (DUMET et al., 1993). A segunda hipótese é de substituição da água (“water replacement hypothesis”) onde os açúcares substituiriam a água removida das biomoléculas de modo a manter as estruturas hidrofílicas em sua conformação hidratada mesmo após a água ser removida. Esta hipótese surgiu com base em experimentos onde se verificou que grupos hidroxilas dos açúcares se ligaram através de pontes de hidrogênio aos grupos hidrofílicos das cabeças polares dos fosfolipídios e das proteínas da bicamada da membrana de modo a atuar em substituição a água (CROWE et al., 1984).

A crioproteção também tem sido realizada com soluções compostas de mistura de crioprotetores. Heringer et al. (2013) discorre que entre as misturas padrão utilizadas na crioproteção, as PVS (*Plant vitrification solution*) se destacam e a mais utilizada destas é a PVS2. A solução denominada de PVS2 é composta por 0,4 M de sacarose, 30% (v/v) de glicerol, 15% (v/v) de etilenoglicol e 15% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO). Já a solução de PVS1 é composta de glicerol (22% v/v), etilenoglicol (15% v/v), propileno glicol (15% v/v), dimetilsulfóxido (DMSO) (7% v/v) e sorbitol (9,1% v/v). E a solução de PVS3 por 40% (v/v) de glicerol e 40% (v/v) de sacarose) (FRIZZO, 2013).

As técnicas de criopreservação são baseadas na vitrificação, que consiste em um processo através do qual a água sofre uma transição da fase líquida para um estado sólido amorfo e meta-estável, o sólido assim formado é na verdade uma solução supersaturada de alta viscosidade (SANTOS, 2000). O termo vitrificação refere-se ao processo físico de transição de uma solução aquosa para um estado sólido amorfo (não cristalino), durante o ultra-resfriamento

rápido (FAHY et al, 1984). A vitrificação do citoplasma celular previne a formação de cristais de gelo intracelular e, portanto, órgãos e tecidos vegetais submetidos à vitrificação podem se manter íntegros à temperatura do nitrogênio líquido, sendo capazes de regenerar plantas via cultivo in vitro (SANTOS, 2001).

A vitrificação do citoplasma é obtida experimentalmente através da desidratação dos tecidos para um grau de umidade em que não existe água livre para a cristalização antes de mergulhar em nitrogênio líquido. Com isto a solução celular se torna muito concentrada e pode passar pela transição de vitrificação quando uma velocidade de congelamento apropriada é utilizada, evitando deste modo a formação de gelo durante a exposição a temperaturas subzero (SANTOS, 2000).

O ponto crítico para se obter sobrevivência usando protocolos de vitrificação é a desidratação e não o congelamento; se a amostra for desidratada até o teor de água tolerado, obtém-se alta sobrevivência na maioria dos casos (SANTOS, 2001). Outro ponto importante é quantificar o tempo ideal da exposição das amostras à solução vitrificante. O aumento da tolerância à solução vitrificante pode ser conseguido por meio de pré-condicionamento do material vegetal e de tratamentos de saturação ou “loading” (FERNANDES, 2008).

Como pré-condicionamento, existem duas possibilidades, a aclimação a frio e a submissão do material vegetal em meio rico em açúcares ou ambos. Para muitas espécies, a pré-cultura em meio rico em sacarose parece não ser suficiente para aumentar a tolerância à solução vitrificante, para outras espécies, a exposição direta à solução vitrificante concentrada pode ser tóxica (FERNANDES, 2008).

A diminuição no grau de umidade causada pela imersão na solução PVS2 é essencial para realizar a criopreservação. É um fator importante para a recuperação e sobrevivência do material, porque permite reduzir o teor de água das células evitando danos da formação cristais de gelo no congelamento. No entanto, é necessário adequar a metodologia de uso dessa solução, pois pode ocorrer toxidez de algumas substâncias (GALDIANO JÚNIOR, 2013).

2.4.2 Congelamento lento e rápido

O protocolo por meio de congelamento lento foi uma das primeiras técnicas usadas para criopreservar material vegetal. Esse protocolo é realizado em duas etapas, na primeira o material é resfriado lentamente na velocidade entre 1 e 10°C.hora⁻¹ até que se atinjam temperaturas entre -30 e -40°C e depois o material é imerso diretamente no NL a -196°C (FRIZZO, 2013).

A velocidade de congelamento é um fator determinante sobre a formação de cristais de gelo, formato e tamanho (MATA et al., 2003). Uma vez que o resfriamento lento do material faz com que o seu meio extracelular sofra congelamento, isso diminui a pressão de vapor no meio extracelular e a torna maior no interior da célula. Esse processo causa uma desidratação celular devido a difusão da água presente no interior das células para o meio extracelular, quando a água atinge o meio extracelular congela rapidamente (SANTOS, 2001).

Esse processo, chamado de desidratação induzida por congelamento (“freeze-induced desiccation”), faz a concentração de solutos do citoplasma celular aumentar e a célula perder turgor até entrar em equilíbrio com o potencial hídrico extracelular e, assim, a água livre das células é completamente removida evitando que se torne gelo em seu interior e cause danos a sua estrutura. Assim, se o processo de congelamento lento for realizado adequadamente o mergulho do material biológico posteriormente em nitrogênio líquido terá pouco efeito na formação de gelo intracelular (GOLDFARB et al., 2010).

Apesar da eficiência do congelamento lento alguns autores indicam o congelamento rápido. Neste segundo método as células são resfriadas rapidamente, evitando a formação de grandes cristais de gelo que poderiam perfurá-las. Quando o material é resfriado de maneira tão rápida como em NL os cristais que se formam no espaço intracelular são tão pequenos que não chegam a causar dano (FRIZZO, 2013; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Em temperaturas menores que -130°C existem apenas dois estados físicos nas células, o cristalino e o vítreo os quais podem ser obtidos através da utilização de crioprotetores (KARTHA, 1985).

2.4.3 Descongelamento

O descongelamento do material criopreservado é uma etapa tão crucial quanto o congelamento. Nessa etapa podem se formar cristais de gelo que danificam as estruturas celulares das sementes, então, por isso, o descongelamento deve ser o mais breve possível a fim de evitar esse problema (CARVALHO; VIDAL, 2003; GOLDFARB, 2008).

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. O autor supõe que estas injúrias sejam resultantes do processo de desvitrificação (passagem de água do estado vítreo ou amorfo para o estado líquido) 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 são realizados por meio da rápida imersão das amostras congeladas em banho de água mantido a 40°C. Desta forma, não existe tempo para a recristalização do gelo, evitando assim as injúrias provocadas à membrana celular.

Santos e Salomão (2010) citam como formas de descongelamento a exposição do material em banho-maria a temperatura próxima de 40°C, ou a temperatura ambiente por tempo suficiente para ocorrer o completo descongelamento do material. A primeira opção parece ser mais eficaz, por promover um descongelamento mais rápido. Assim, há uma transição acelerada pela zona de temperatura que pode ocorrer a formação de gelo.

No entanto em pesquisa realizada por Coelho (2006), com sementes de algodão criopreservadas a -170 e -196°C, constatou que o descongelamento a temperatura ambiente não afetou o vigor das sementes.

2.5 BANCO DE GERMOPLASMA

Devido a destruição massiva das vegetações nativas a conservação de recursos genéticos de plantas tornou-se uma questão de interesse mundial, visando prevenir a erosão genética e promover a preservação das espécies (NOGUEIRA, 2010).

O termo germoplasma é entendido como o material que constitui a base física da herança e que é transmitido de uma geração para outra. Do ponto de vista etimológico, germoplasma é uma palavra de duas raízes: *germo*, do latim *germen*, que significa "princípio rudimentar de um novo ser orgânico"; e *plasma*, do grego *plasma*, que significa "a formação" e, em sentido geral, "a matéria não definida". Portanto, germoplasma significa a matéria onde se encontra um princípio que pode crescer e se desenvolver, sendo definido, como a soma total dos materiais hereditários de uma espécie (NASS et al., 2001).

Bancos de germoplasma são coleções de material vivo, em forma de sementes, pólen, tecidos ou indivíduos cultivados, que visam a conservação da diversidade genética das espécies vegetais, especialmente daquelas de importância sócio-econômica que estejam ameaçadas pela erosão genética e/ou que demandem ações para o melhoramento genético (PEREIRA NETO, 2004).

Segundo Veiga et al. (2006), o germoplasma contém os genes que dirigem o desenvolvimento de qualquer ser vivo e constituem a base física da herança biológica. É da combinação de genes que surgem as diversidades genéticas que, por sua vez, têm sido a base do melhoramento de culturas no passado, presente e futuro.

Os recursos genéticos são conservados em bancos ou coleções de germoplasma de duas formas basicamente: podem ser conservados em seu habitat natural (*in situ*), ou em condições diferentes as do seu habitat natural (*ex situ*). A conservação *ex situ* pode ser realizada de várias formas: conservação a campo, em câmeras frias, em laboratórios *in vitro* e em botijões de nitrogênio líquido (VEIGA et al., 2006).

Os Bancos de Germoplasma foram sendo organizado por volta dos anos 1970 para preservar o germoplasma *ex situ*, devido à perda da biodiversidade no campo em função das práticas agrícolas e do uso de variedades modernas (PEREIRA NETO, 2004).

Quando o objetivo é a conservação de material genético a semente é o material preferencial para estabelecer protocolos eficientes e propagar plantas. Assim, a criopreservação de sementes é uma técnica interessante para uma estratégia de conservação (FERNANDES, 2008).

As principais coleções existentes de germoplasma vegetal *ex situ* são a: Coleção de Base, Coleção Ativa, Coleção de Trabalho, Coleção a Campo, Coleção *in vitro*, Coleção em Criopreservação, Coleção Nuclear e Banco Genômico (PEREIRA NETO, 2004).

O Banco Genômico refere-se a a conservação na forma de DNA e seus fragmentos. A Coleção de Base destina-se a conservação de acessos de germoplasma, por longos períodos, na forma de sementes, com grau de umidade entre 3 e 7% e temperatura variando de -18 a -20°C, para espécies com sementes ortodoxas (MORALES; VALOIS, 1996).

A Coleção Ativa mantém os acessos conservados a médio prazo, com temperatura acima de zero grau e abaixo de 15°C e umidade entre 3 e 7%. A estrutura física que conserva a Coleção Ativa tem sido denominada Banco Ativo de Germoplasma (BAG). Suas principais funções são a multiplicação, caracterização, distribuição de amostras dos acessos e a alimentação da coleção de base. A Coleção de Trabalho mantém o germoplasma armazenado a curto prazo e, geralmente, está ligada a um programa de melhoramento genético (MORALES; VALOIS, 1996).

As Coleções de Campo e *in vitro* são mantidas para espécies recalcitrantes ou com propagação vegetativa, enquanto a Coleção *in vitro* é utilizada para conservar células, órgãos e tecidos em meio de cultura, a Coleção de Campo conserva as plantas nos bancos ativos de germoplasma. A Coleção Nuclear ou *Core Collection* é organizada para melhor representar a variabilidade genética disponível, assim como para estimular a utilização do germoplasma. É uma coleção que corresponde a 10% da coleção original, com cerca de 80% da representatividade genética da espécie (MORALES; VALOIS, 1996).

A Coleção em Criopreservação utiliza uma técnica que mantém o germoplasma de qualquer forma (sementes, pólen, calo, ápice caulinar, meristemas e embrião) conservado em nitrogênio líquido -196°C , com potencial para preservação sem limite de tempo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Vegetal e na Casa de Vegetação da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) *campus* Laranjeiras do Sul – Paraná. O trabalho foi dividido em oito experimentos.

3.1 ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO DAS SEMENTES

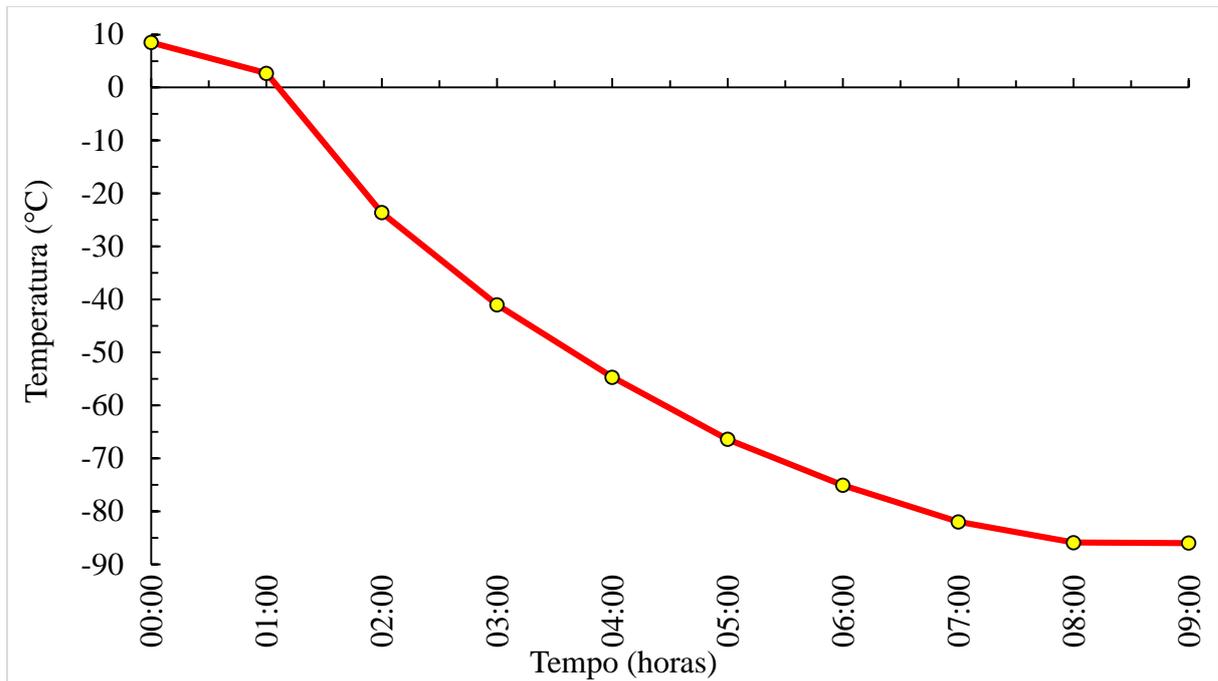
As sementes de *A. angustifolia* utilizadas na execução do experimento I foram obtidas na Reserva Indígena do município de Mangueirinha – PR. Para realização dos experimentos II e III foram utilizadas sementes coletadas no município de Guarapuava – PR. Os experimentos IV e V foram montados com sementes adquiridas em Laranjeiras do Sul – PR. Por fim, os experimentos VI, VII e VIII foram executados com sementes coletadas no município de Chopinzinho – PR.

Para homogeneização das sementes foram selecionadas apenas as maduras e que não apresentavam as seguintes características: pinhões brotados, inchados ou com qualquer sinal de início de germinação, doentes, menores que 3,5 cm, chochos (muito leves, com sinal de amêndoa desprendida) e sementes com sinal de ataque de larvas de *Cydia araucariaceae*, larvas que se alimentam do embrião da semente. Foram consideradas sementes maduras aquelas que possuíam 50% ou mais da sua área com a coloração escura (avermelhada).

3.2 EXPERIMENTO I – CONGELAMENTO EM ULTRAFREEZER E CRIOPRESERVAÇÃO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA.

Para execução do experimento I realizou-se a remoção do tegumento das sementes a fim de se obter apenas as amêndoas. As amêndoas foram enroladas em papel alumínio e envoltas com uma camada externa de filme PVC (Polyvinyl chloride). Então foram divididas em dois grupos, um foi imerso em nitrogênio líquido por um período de duas horas e outro foi colocado em ultrafreezer, onde permaneceram por 9 horas até atingirem a temperatura de -86°C , conforme gráfico abaixo:

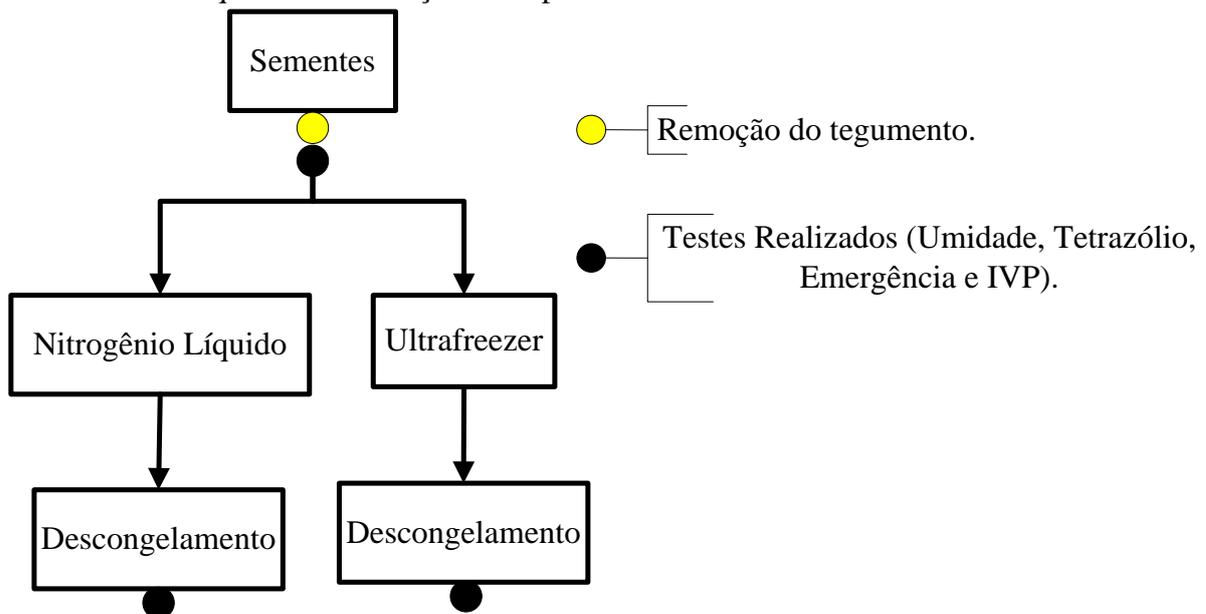
GRÁFICO 1 – Redução da temperatura do ultrafreezer durante o período de congelamento.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Concluído o período de congelamento as amêndoas foram acondicionadas em pacotes plástico zipado, os quais foram colocados em banho maria pelo período de uma hora à 40°C para o descongelamento. Este procedimento visou evitar o contato direto da amêndoa congelada com a água aquecida. Avaliações de umidade, tetrazólio, emergência e índice de velocidade de protrusão radicular foram realizadas em diferentes períodos conforme figura abaixo:

FIGURA 3 – Esquema de execução do experimento I

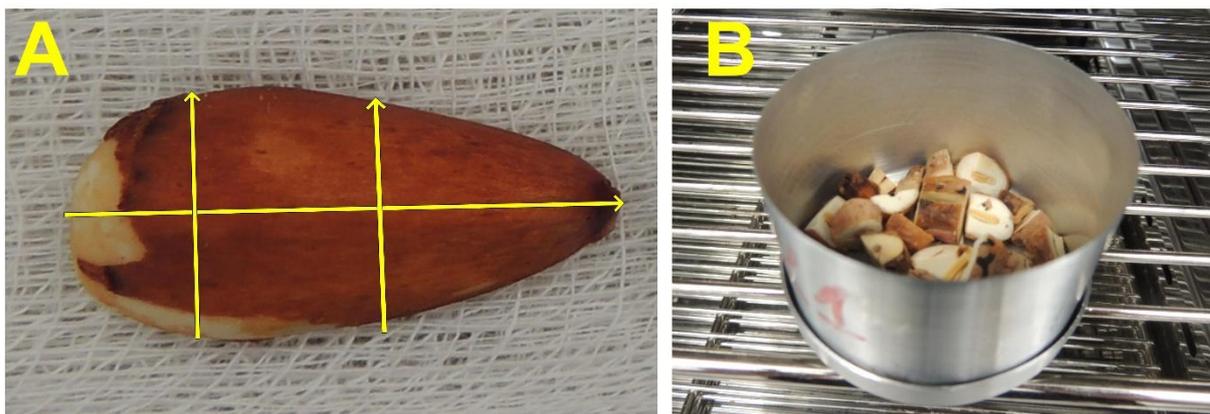


Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.1 Determinação do grau de umidade

Para determinação do grau de umidade adotou-se o método padrão de estufa descrito nas regras para análise de sementes (RAS) (BRASIL, 2009), a 105°C durante 24 horas. Foram utilizadas duas repetições de 5 amêndoas por tratamento, que receberam dois cortes transversais e um corte longitudinal (Imagem 1), conforme metodologia de Santos (2014).

IMAGEM 1 – Determinação do grau de umidade.



A – Demonstração dos cortes realizados nas amêndoas para a determinação do grau de umidade; **B** – Cadinho com amostra na estufa com circulação de ar forçada;

3.2.2 Teste de tetrazólio

Foram utilizadas quatro repetições de 25 amêndoas as quais foram embebidas em água destilada por 18 horas de acordo com a RAS (BRASIL, 2009). Após a embebição foi realizada a excisão dos embriões com auxílio de bisturi, por meio de cortes nas laterais do endosperma até se aproximar ao embrião, onde então, prosseguiu a excisão manualmente para não danificar o embrião.

Os embriões foram imersos diretamente em sal de tetrazólio na concentração de 0,075% e mantidos em BOD, sem luz por quatro horas na temperatura de 30°C (SILVA, 2015). Posteriormente foram lavados em água corrente e classificados em estereoscópio da marca Olympus modelo SZX7, em dois grupos: viáveis e inviáveis conforme metodologia de Oliveira et al., (2014).

Foram considerados viáveis aqueles embriões que apresentaram coloração rosa e tecidos com aspecto normal e firme, ou quando menos de 50% dos cotilédones estavam descoloridos ou com coloração vermelho intensa e não tinha afetado a região de ligação com o eixo embrionário. Foram considerados inviáveis os embriões que apresentavam 50% ou mais dos cotilédones descoloridos ou com coloração vermelho intensa e aqueles que apresentavam danos no eixo embrionário.

3.2.3 Teste de emergência de plântulas

O teste de emergência foi realizado em bandejas com 42,2cm comprimento x 34cm largura x 8,4cm altura, utilizando quatro repetições de 25 amêndoas por tratamento. Foi utilizado 6 L de areia peneirada em malha de 2 mm e autoclavada a 120°C por 15min. As amêndoas foram semeadas com inclinação de aproximadamente 45° enterrando dois terços da amêndoa. As bandejas foram mantidas em casa de vegetação com condições controladas por 60 dias. A temperatura utilizada foi de 25±2°C e a irrigação realizada duas vezes por dia utilizando sistema de aspersão com duração de 4 minutos cada, uma as 8:00 horas e a outra as 18:00 horas, com uma vazão de 1,2 L.min⁻¹.aspersor⁻¹.

Foram consideradas plântulas normais aquelas emergidas pelo menos 3 cm acima nível do substrato.

3.2.4 Índice de velocidade de protrusão radicular (IVP)

Foi realizado simultaneamente com o teste de emergência de plântulas, em que a cada três dias foram realizadas observações e contagem da emissão da raiz primária. Foram consideradas as amêndoas que apresentavam raiz primária maiores que 0,5 cm. As contagens foram realizadas até 60° dia.

O índice de velocidade de protrusão radicular (IVP) foi calculado pela fórmula proposta por Maguire (1962) para emergência de plântulas, com adaptações.

$$IVP = \frac{P1}{T1} + \frac{P2}{T2} + \dots + \frac{Pi}{Ti}$$

Onde:

P1, P2, Pi - é o número de amêndoas com a radícula maior que 0,5cm a cada dia;

T1, T2, Ti - é o tempo (dias).

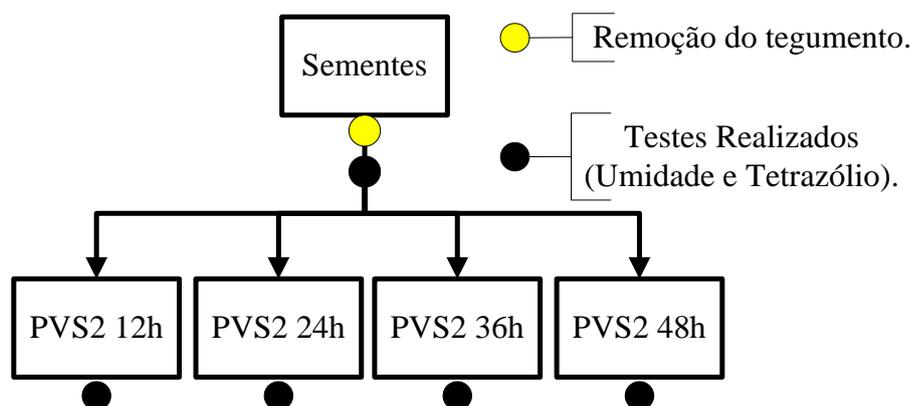
3.2.5 Delineamento experimental e análise estatística para o experimento I

Foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com 3 tratamentos e quatro repetições: testemunha, criopreservação em nitrogênio líquido por 2 horas e congelamento em ultrafreezer por 9 horas. Os resultados foram apenas comparativos entre si sem realização de análise estatística, este experimento foi considerado como experimento pré-teste.

3.3 EXPERIMENTO II – – REDUÇÃO DO GRAU DE UMIDADE E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS SEMENTES DE ARAUCÁRIA TRATADOS COM PVS2 POR DIFERENTES PERÍODOS DE TEMPOS.

As sementes de *A. angustifolia* tiveram o tegumento removido e em seguida foram imersas em 2 litros de solução PVS2 (glicerol 30%, etilenoglicol 15%, dimetilsulfóxido 15% e sacarose 0,4 Mol.L⁻¹) por diferentes períodos de tempo 0, 12, 24, 36 e 48 horas. A solução foi aerada com uma bomba de aquário ligada a uma pedra porosa. Concluído cada período de imersão as amêndoas foram lavadas em água corrente por 30 segundos e secas em papel germitest. Em seguida, foram realizados os testes de umidade e de tetrazólio conforme representado na figura a seguir:

FIGURA 4 – Esquema de execução do experimento II.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.1 Determinação do grau de umidade

Para determinação do grau de umidade seguiu-se o item 3.2.1.

3.3.2 Teste de tetrazólio

Para determinação do teste de tetrazólio seguiu-se o item 3.2.2.

3.3.3 Delineamento experimental e análise estatística para o experimento II

O delineamento experimental utilizado para o experimento II foi o inteiramente casualizado com 5 tratamentos: imersão em solução PVS2 por 0, 12, 24, 36 e 48 horas. Os resultados foram submetidos a análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de significância utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

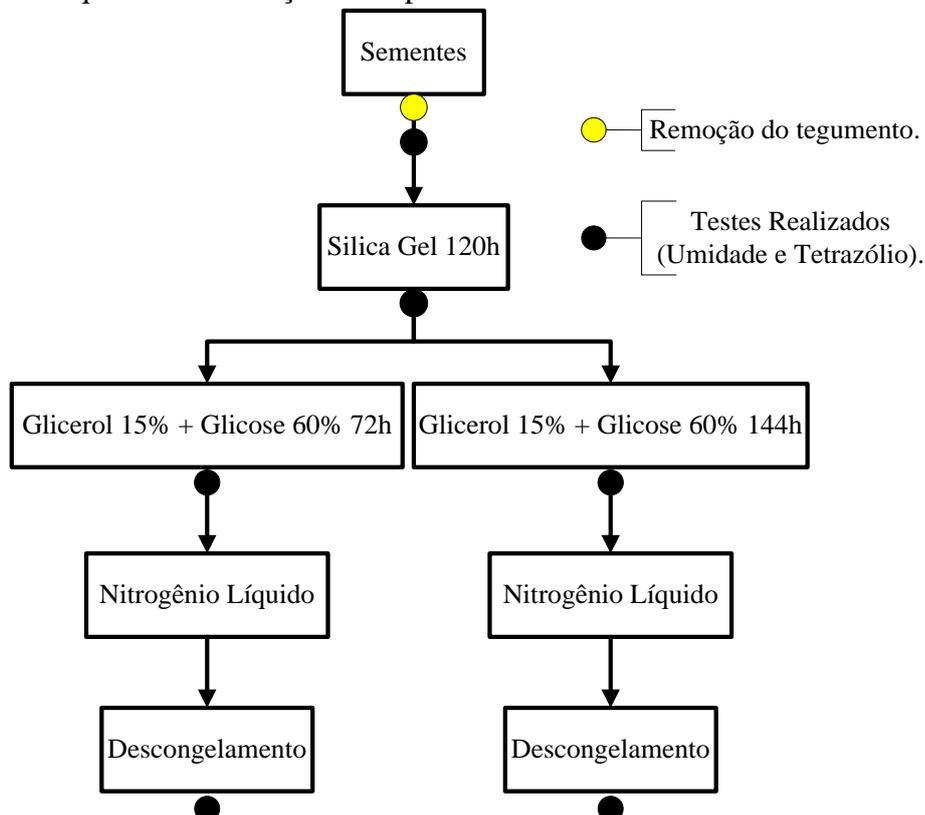
3.4 EXPERIMENTO III – VIABILIDADE DAS SEMENTES DE ARAUCÁRIA DESIDRATADAS EM SÍLICA GEL E CRIOPROTEGIDAS EM SOLUÇÃO DE GLICEROL + GLICOSE POR DIFERENTES PERÍODOS DE TEMPO

Para o experimento III as sementes de *A. angustifolia* tiveram o tegumento removido e em seguida 150 amêndoas foram colocadas em dessecador contendo 800g de sílica gel, onde permaneceram por 120 horas. Durante este período a sílica gel foi trocada por três vezes, visando a redução do grau de umidade mais eficiente das amêndoas. Após a retirada da sílica gel as amêndoas foram imersas em 2 litros de solução de glicose (60%) + glicerol (15%) pelos tempos de zero, 72 e 144 horas. A imersão das amêndoas na solução foi realizada em bandeja com aeração fornecida por uma bomba de aquário ligada a uma pedra porosa.

Concluído o período de imersão, as amêndoas foram lavadas em água corrente por 30 segundo e secas em papel germitest, posteriormente, foram colocadas em tubos falcon de 50ml e criopreservadas em nitrogênio líquido por duas horas.

O descongelamento foi em banho maria a 40° C por uma hora, colocando os tubos falcon com as amêndoas em seu interior em contato direto com a água aquecida. Em seguida foram realizados os testes de umidade e de tetrazólio em cada uma das referidas etapas conforme representado na figura abaixo:

FIGURA 5 – Esquema de execução do experimento III.



Fonte: Elaborado pelo autor

3.4.1 Determinação do grau de umidade

Para determinação do grau de umidade seguiu-se o item 3.2.1.

3.4.2 Teste de tetrazólio

Para determinação do teste de tetrazólio seguiu-se o item 3.2.2.

3.4.3 Delineamento experimental e análise estatística para o experimento III

Para o experimento III adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com 5 tratamentos e quatro repetições: testemunha; sílica gel por 120 horas; sílica gel por 120 horas + imersão em solução de glicose (60%) e glicerol (15%) por 72; sílica gel por 120 horas + imersão em solução de glicose (60%) e glicerol (15%) por 144 horas e sílica gel por 120 horas + imersão em solução de glicose (60%) e glicerol (15%) por 144 horas + imersão em nitrogênio líquido por 2 horas. Os resultados foram submetidos a análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de significância utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

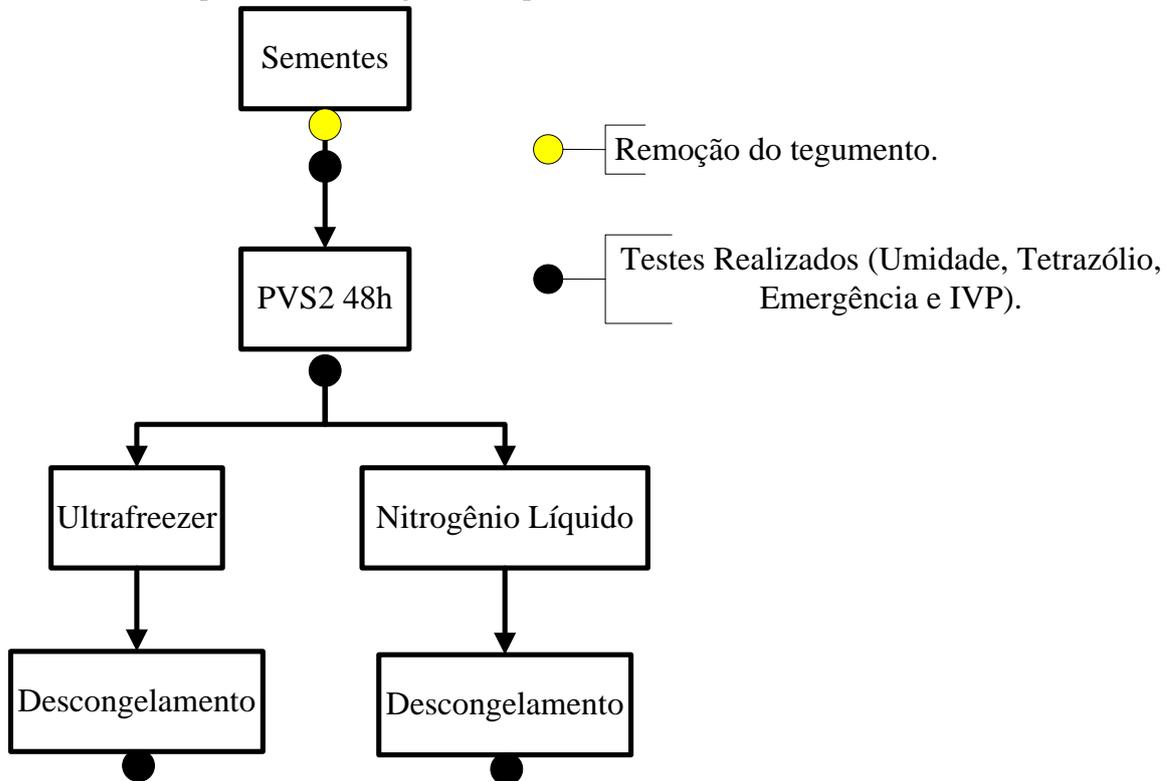
3.5 EXPERIMENTO IV – CRIOPROTEÇÃO DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA EM PVS2 COM POSTERIOR CRIOPRESERVAÇÃO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO E CONGELAMENTO EM ULTRAFREEZER.

Para o experimento IV o tegumento das sementes foi removido e, em seguida, realizada a imersão das amêndoas em 2,5 litros de solução PVS2 por 48 horas. A solução foi aerada com uma bomba de aquário ligada a uma pedra porosa. Após este período as amêndoas foram lavadas em água corrente por 30 segundos e depois secas em papel germitest.

Concluído este procedimento as amêndoas foram enroladas em papel alumínio e envoltas com uma camada externa de filme PVC (Polyvinyl chloride). Então foram divididas em dois grupos, um foi imerso em nitrogênio líquido por um período de duas horas e outro foi colocado em ultrafreezer, onde permaneceram por 9 horas até atingirem a temperatura de -86°C (Gráfico 1).

O descongelamento foi realizado conforme experimento I. Avaliações de umidade, tetrazólio, emergência de plântulas e índice de velocidade de protrusão radicular foram realizadas em diferentes períodos conforme figura abaixo:

FIGURA 6 – Esquema de execução do experimento IV



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5.1 Determinação do grau de umidade

Para determinação do grau de umidade seguiu-se o item 3.2.1.

3.5.2 Teste de tetrazólio

Para determinação do teste de tetrazólio seguiu-se o item 3.2.2.

3.5.3 Teste de emergência de plântulas

Para o teste de emergência de plântulas seguiu-se o item 3.2.3.

3.5.4 Índice de velocidade de protrusão radicular (IVP)

Para determinação do IVP seguiu-se o item 3.2.4.

3.5.5 Delineamento experimental e análise estatística para o experimento IV

No experimento IV foi realizado o delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e quatro repetições: testemunha; imersão em PVS2 por 48 horas; imersão em PVS2 por 48 horas + criopreservação em nitrogênio líquido por 2 horas e imersão em PVS2 48 horas

+ congelamento em ultrafreezer por 9 horas. Os resultados foram submetidos a análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de significância utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

3.6 EXPERIMENTO V – CRIOPRESERVAÇÃO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO E CONGELAMENTO EM ULTRAFREEZER DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA DESIDRATADAS COM SÍLICA GEL E CRIOPROTEGIDAS EM GLICEROL + GLICOSE

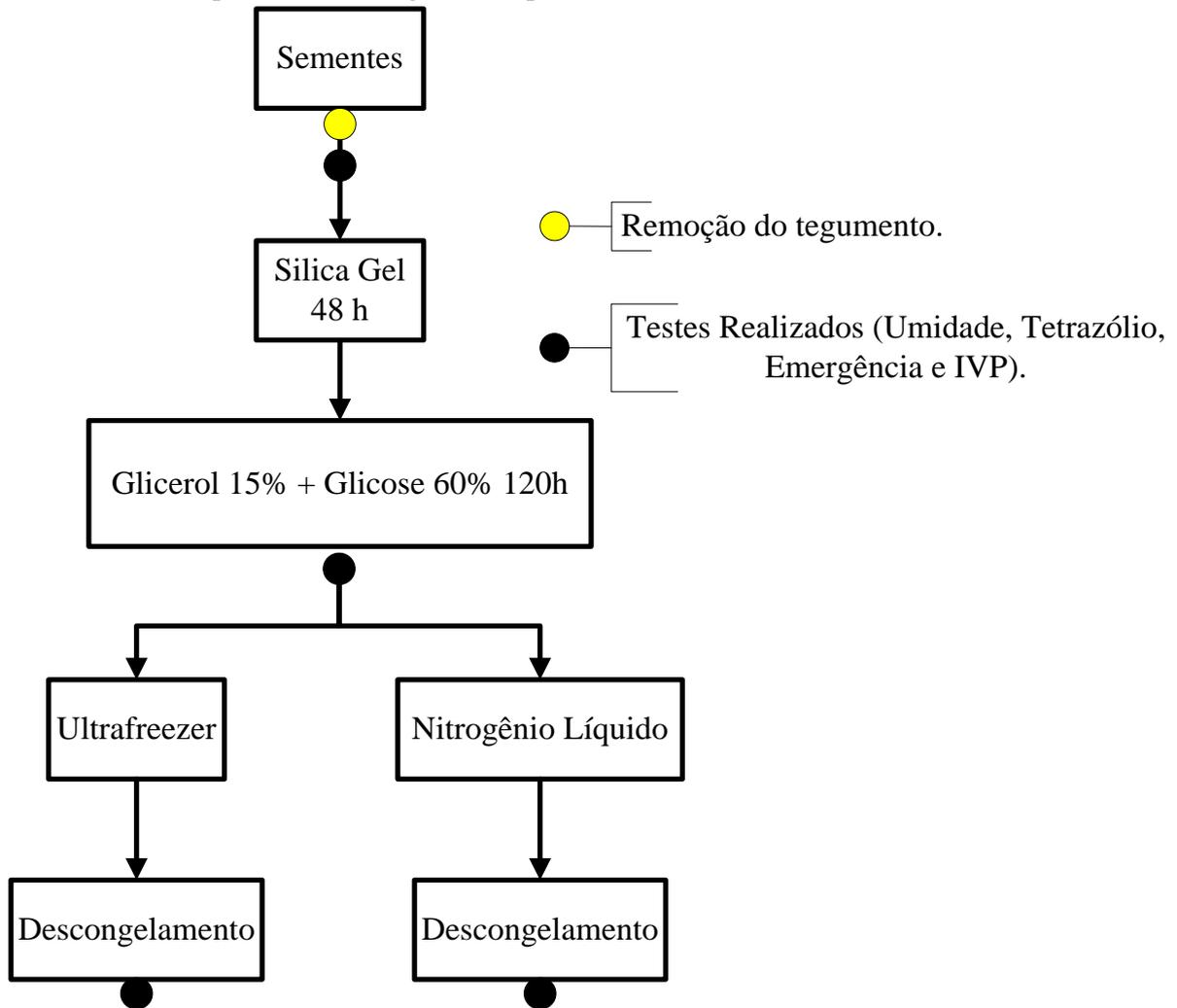
Para o experimento V as sementes de *A. angustifolia* tiveram o tegumento removido e em seguida 210 amêndoas foram colocadas em dessecador contendo 800g de sílica gel, onde permaneceram por 48 horas. Durante este período a sílica gel foi trocada por três vezes, visando a redução do grau de umidade mais eficiente das amêndoas. Após a retirada da sílica gel as amêndoas foram imersas em 2,5 litros de solução de glicose (60%) + glicerol (15%) por 120 horas. A imersão das amêndoas na solução foi realizada em bandeja com aeração fornecida por uma bomba de aquário ligada a uma pedra porosa.

Concluído o período de imersão as amêndoas foram lavadas em água corrente por 30 segundo e secas em papel germitest. Posteriormente as amêndoas foram enroladas em gaze e colocadas em tubos falcon de 50ml, três amêndoas enroladas por tubo.

Os tubos falcon contendo as amêndoas foram divididos em duas partes, uma foi imersa em nitrogênio líquido, por um período de duas horas e outra parte dos tubos foi colocada em ultrafreezer, onde permaneceram por 9 horas até atingirem a temperatura de -86°C (Gráfico 1).

Após o congelamento (NL e ultrafreezer), os tubos foram acondicionados em pacotes plástico zipado, os quais foram colocados em banho maria pelo período de uma hora à 40°C para o descongelamento. Este procedimento visou evitar o contato direto da amêndoa congelada com a água aquecida. Avaliações de umidade, tetrazólio, emergência de plântulas e índice de velocidade de protrusão radicular foram realizadas em diferentes períodos conforme o esquema a seguir:

FIGURA 7 – Esquema de execução do experimento V



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6.1 Determinação do grau de umidade

Para determinação do grau de umidade seguiu-se o item 3.2.1.

3.6.2 Teste de tetrazólio

Para determinação do teste de tetrazólio seguiu-se o item 3.2.2.

3.6.3 Teste de emergência de plântulas

Para o teste de emergência de plântulas seguiu-se o item 3.2.3.

3.6.4 Índice de velocidade de protrusão radicular (IVP)

Para determinação do IVP seguiu-se o item 3.2.4.

3.6.5 Delineamento experimental e análise estatística para o experimento V

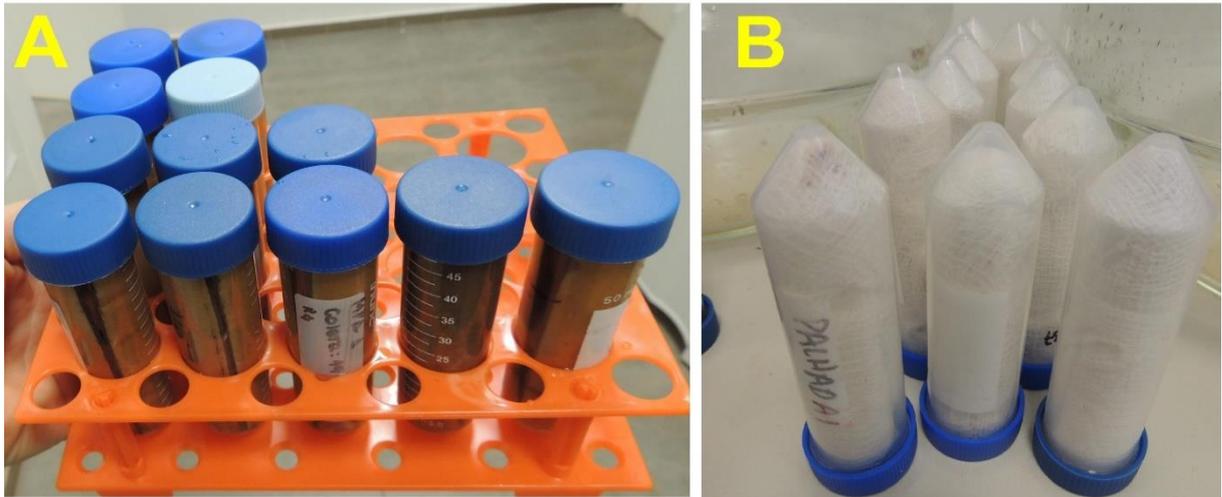
Este experimento foi realizado em delineamento experimental inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 4 repetições: testemunha; sílica gel 48 horas + imersão em solução de glicerol (15%) e glicose (60%); sílica gel 48 horas + imersão em solução de glicerol (15%) e glicose (60%) + criopreservação em nitrogênio líquido por 2 horas e sílica gel 48 horas + imersão em solução de glicerol (15%) e glicose (60%) + congelamento em ultrafreezer por 9 horas. Os resultados foram submetidos a análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de significância utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

3.7 EXPERIMENTO VI – CRIOPRESERVAÇÃO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO E CONGELAMENTO EM ULTRAFREEZER DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA PRÉ ACLIMATADAS E CRIOPROTEGIDAS EM PVS2.

Para realização do experimento VI o tegumento das sementes foi removido. As amêndoas foram submetidas a uma pré aclimação em soluções com menor concentração osmótica antes de serem imersas em PVS2 e congeladas. A pré aclimação foi realizada dentro de dessecador que permaneceu em sala com temperatura controlada de 25°C. Após a imersão das amêndoas nas soluções de pré aclimação, os dessecadores foram fechados e com uma bomba elétrica feito um vácuo de -17 pol Hg (polegadas de mercúrio), por dois minutos, a cada troca de solução. Após o vácuo abriu-se parcialmente o dessecador para se colocar uma bomba de aquário ligada a uma pedra porosa para fornecimento de aeração pelo resto do período de permanência das amêndoas na solução. As amêndoas permaneceram 24 horas em 2,5 litros de solução com 0,3M de sacarose, depois ficaram 12 horas em 2,5 litros de solução com 2M de glicose + 0,4M de sacarose e 24 horas em 2,5 litros com PVS2. Ao serem retiradas de cada solução as amêndoas foram lavadas em água corrente por 30 segundos e ao saírem da última solução lavadas em água corrente e secas em papel germitest.

Após a imersão na solução de PVS2 as amêndoas foram colocadas em tubo falcon de 50ml, três amêndoas por tubo e divididas em duas partes, uma das partes os tubos falcon, com três amêndoas, foram preenchidos com solução de PVS2, para homogeneizar o congelamento em nitrogênio líquido, por 2 horas. Na outra parte os tubos falcon não foram preenchidos com solução de PVS2, sendo congelados diretamente em nitrogênio líquido por duas horas.

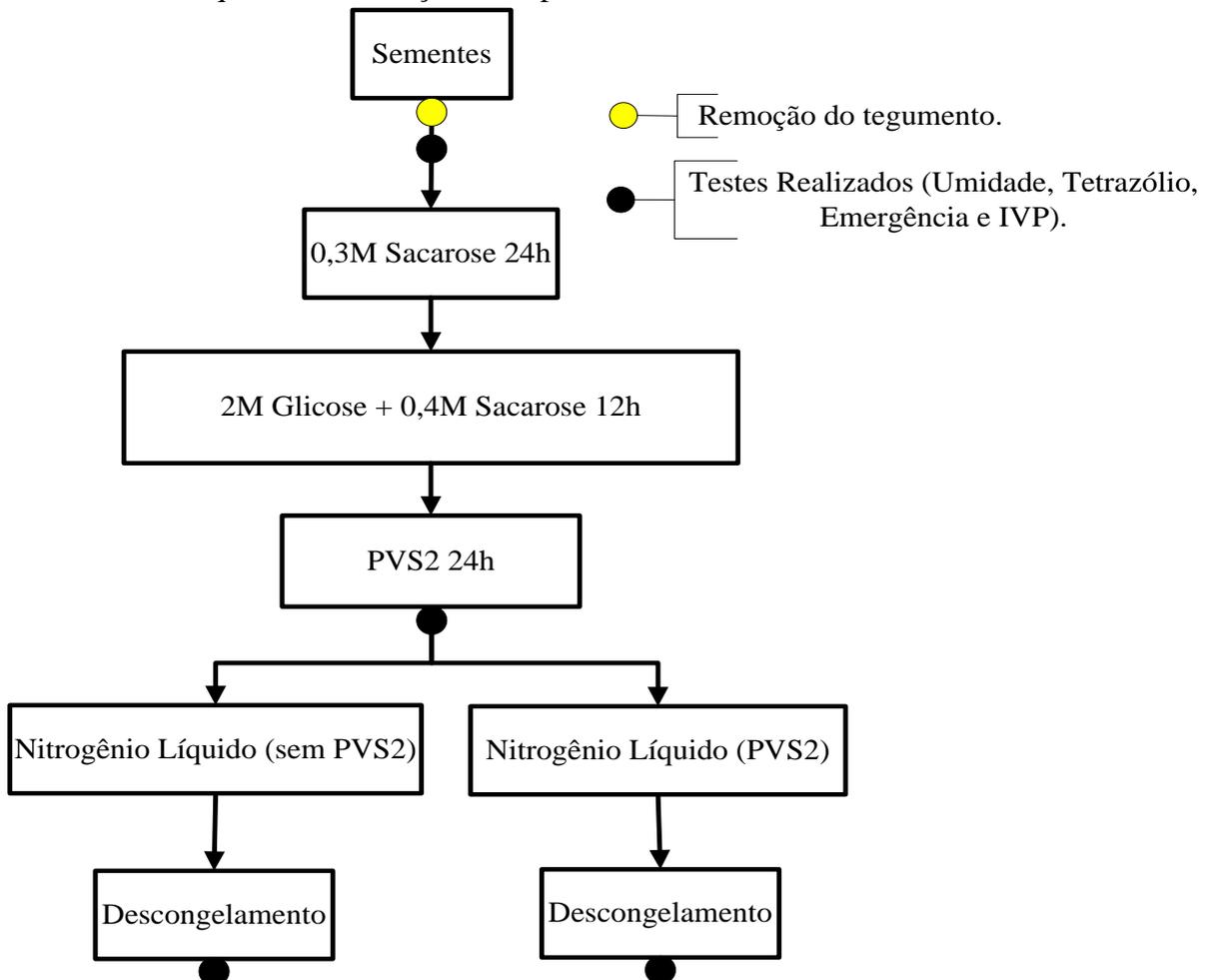
IMAGEM 2 – Demonstração do experimento VI.



A – Demonstração dos tubos falcon com as amêndoas submersas no PVS2; **B** – Demonstração dos tubos falcon com as amêndoas envoltas em gaze.

O descongelamento foi realizado conforme experimento V. Avaliações de umidade, tetrazólio, emergência de plântulas e índice de velocidade de protrusão radicular foram realizadas em diferentes períodos conforme o esquema a seguir:

FIGURA 8 – Esquema de execução do experimento VI



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.7.1 Determinação do grau de umidade

Para determinação do grau de umidade seguiu-se o item 3.2.1.

3.7.2 Teste de tetrazólio

Para determinação do teste de tetrazólio seguiu-se o item 3.2.2 com modificação apenas no número de amêndoas por repetição, o qual passou de 4 repetições com 25 amêndoas para 5 repetições com 10 amêndoas.

3.7.3 Teste de emergência de plântulas

Para o teste de emergência de plântulas seguiu-se o item 3.2.3 com modificação apenas no número de amêndoas por repetição, o qual passou de 4 repetições com 25 amêndoas para 5 repetições com 10 amêndoas.

3.7.4 Índice de velocidade de protrusão radicular (IVP)

Para determinação do IVP seguiu-se o item 3.2.4.

3.7.5 Delineamento experimental e análise estatística para o experimento VI

O experimento VI foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 5 repetições: testemunha; amêndoas submetidas a soluções de pré aclimação e ao PVS2; amêndoas submetidas a soluções de pré aclimação e ao PVS2 + criopreservação em nitrogênio líquido por 2 horas com PVS2 e amêndoas submetidas a soluções de pré aclimação e ao PVS2 + criopreservação em nitrogênio líquido por 2 horas sem PVS2. Os resultados foram submetidos a análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de significância utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

3.8 EXPERIMENTO VII – CONGELAMENTO DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA DESIDRATADAS E CRIOPROTEGIDAS COM GLICOSE 60% + GLICEROL 15%.

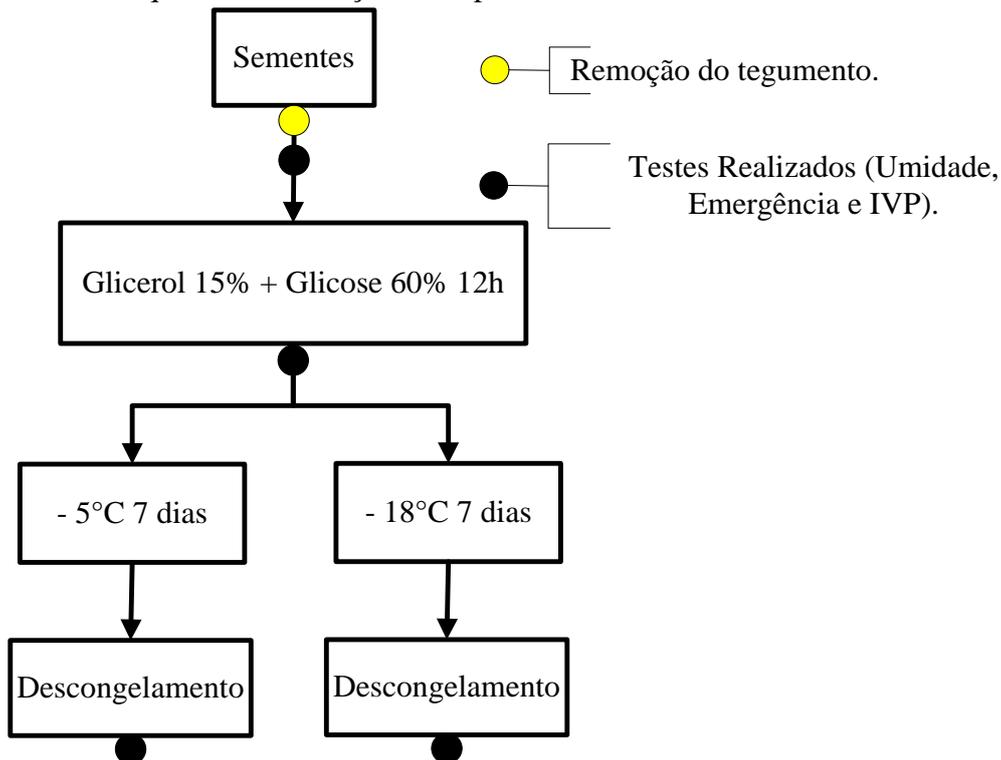
No experimento VII realizou-se a remoção do tegumento das sementes e as amêndoas de *A. angustifolia* foram colocadas em dessecador com 2 litros de solução de glicose 60% + glicerol 15% por um período de 12 horas. O dessecador permaneceu em sala com temperatura controlada de 25°C. Após a imersão das amêndoas na solução de crioproteção o dessecador foi fechado e com uma bomba elétrica realizado vácuo de -17 pol Hg por dois minutos. Concluído

o vácuo abriu-se parcialmente o dessecador para se colocar uma bomba de aquário ligada a uma pedra porosa para fornecimento de aeração pelo resto do período de permanência das amêndoas na solução. Ao serem retiradas da solução as amêndoas foram lavadas em água corrente por 30 segundos e secas em papel germitest.

Após imersão na solução, lavagem e secagem, as amêndoas foram acondicionadas em plásticos zipados e divididas em duas amostras. Uma amostra foi mantida durante 7 dias em geladeira com temperatura controlada de -5°C e outra foi mantida no freezer por 7 dias com temperatura de -18°C .

Após o congelamento por 7 dias nas temperaturas de -5 e -18°C transferiu-se as embalagens (plástico zipado) para o banho maria por uma hora à 40°C . Este procedimento visou evitar o contato direto da amêndoa congelada com a água aquecida. Avaliações de umidade, emergência de plântulas e índice de velocidade de protrusão radicular foram realizadas em diferentes períodos conforme o esquema a seguir:

FIGURA 9 – Esquema de execução do experimento VII



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.8.1 Determinação do grau de umidade

Para determinação do grau de umidade seguiu-se o item 3.2.1.

3.8.2 Teste de emergência de plântulas

Para o teste de emergência de plântulas seguiu-se o item 3.7.3.

3.8.3 Índice de velocidade de protrusão radicular (IVP)

Para determinação do IVP seguiu-se o item 3.2.4.

3.8.4 Delineamento experimental e análise estatística para o experimento VII

No experimento VII adotou-se delineamento experimental inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 5 repetições: testemunha; amêndoas imersas em solução de glicerol (15%) e glicose (60%) por 12 horas; amêndoas imersas em solução de glicerol (15%) e glicose (60%) por 12 horas + congelamento em -5°C por 7 dias e amêndoas imersas em solução de glicerol (15%) e glicose (60%) por 12 horas + congelamento em -18°C por 7 dias. Os resultados foram submetidos a análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de significância utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

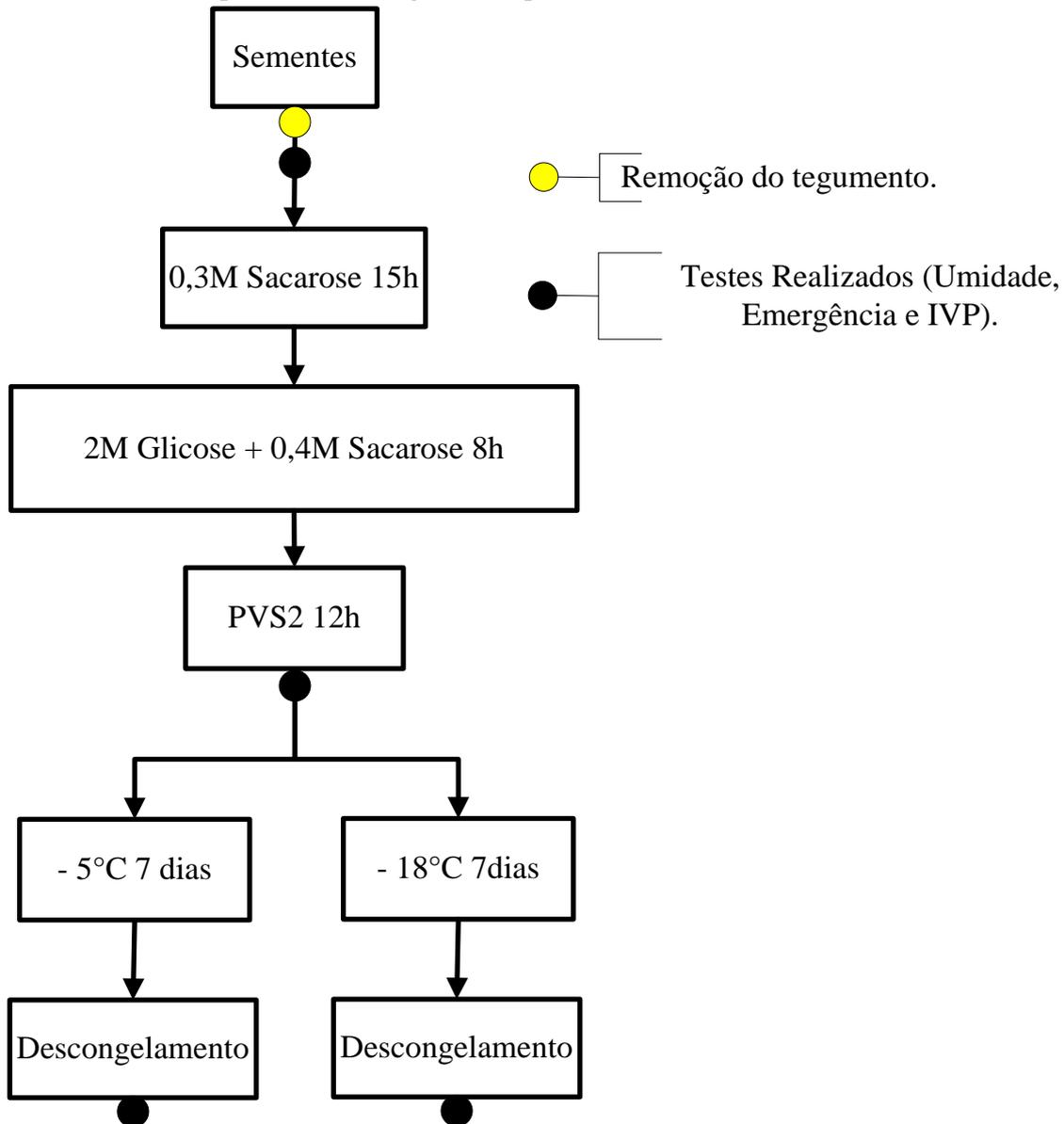
3.9 EXPERIMENTO VIII – ACLIMATAÇÃO, DESIDRATAÇÃO, CRIOPROTEÇÃO COM PVS2 E CONGELAMENTO DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA EM DIFERENTES TEMPERATURAS.

Para realização do experimento VIII o tegumento das sementes foi removido. As amêndoas foram submetidas a uma pré aclimatação em soluções com menor concentração osmótica antes de serem imersas em PVS2 e congeladas. A pré aclimatação foi realizada dentro de dessecador que permaneceu em sala com temperatura controlada de 25°C . Após a imersão das amêndoas nas soluções de pré aclimatação, os dessecadores foram fechados e com uma bomba elétrica feito um vácuo de -17 pol Hg, por dois minutos, a cada troca de solução. Após o vácuo abriu-se parcialmente o dessecador para se colocar uma bomba de aquário ligada a uma pedra porosa para fornecimento de aeração pelo resto do período de permanência das amêndoas na solução. As amêndoas permaneceram 15 horas em 2 litros de solução com 0,3M de sacarose, depois ficaram 8 horas em 2 litros de solução com 2M de glicose + 0,4M de sacarose e 12 horas em 2 litros com PVS2. Ao serem retiradas de cada solução as amêndoas foram lavadas em água corrente por 30 segundos e ao saírem da última solução lavadas em água corrente e secas em papel germitest.

Após imersão nas soluções, lavagem e secagem, as amêndoas foram acondicionadas em plásticos zipados e divididas em duas amostras. Uma amostra foi mantida durante 7 dias na geladeira com temperatura controlada de -5°C e outra foi mantida no freezer por 7 dias com temperatura de -18°C .

O descongelamento foi realizado de acordo com o experimento VII. Avaliações de umidade, emergência de plântulas e índice de velocidade de protrusão radicular foram realizadas em diferentes períodos conforme o esquema a seguir:

FIGURA 10 – Esquema de execução do experimento VIII



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.9.1 Determinação do grau umidade

Para determinação do grau de umidade seguiu-se o item 3.2.1.

3.9.2 Teste de emergência de plântulas

Para o teste de emergência de plântulas seguiu-se o item 3.7.3.

3.9.3 Índice de velocidade de protrusão radicular (IVP)

Para determinação do IVP seguiu-se o item 3.2.4.

3.9.4 Delineamento experimental e análise estatística para o experimento VIII

Para o experimento VIII adotou-se delineamento experimental inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 5 repetições: testemunha; amêndoas imersas em solução de pré aclimação e PVS2; amêndoas imersas em solução de pré aclimação e PVS2 + congelamento em -5°C por 7 dias e amêndoas imersas em solução de pré aclimação e PVS2 + congelamento em -18°C por 7 dias. Os resultados foram submetidos a análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de significância utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

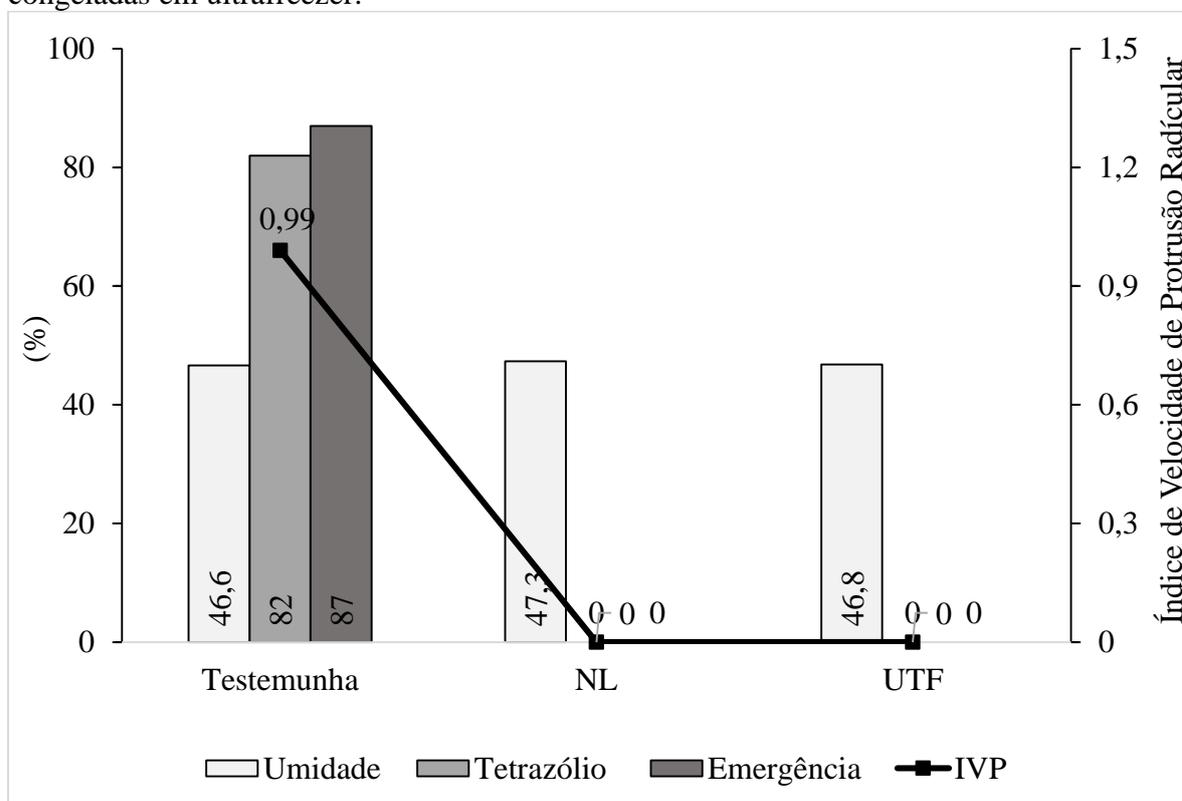
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXPERIMENTO I

O grau de umidade inicial das amêndoas de *A. angustifolia* foi de 46,6%, o vigor medido pelo índice de velocidade de protrusão radicular foi de 0,99 e a viabilidade determinada pelos testes de tetrazólio e emergência de plântulas foi de 82% e 87%, respectivamente (Gráfico 2 e Imagem 4). Este resultado evidencia a importância do teste de tetrazólio para avaliar a viabilidade de sementes de *A. angustifolia*, visto que, o teste de emergência deve ser avaliado por mais de 30 dias (Brasil, 2009), enquanto que, pelo teste de tetrazólio se obtém o resultado em menos de 48h, permitindo assim otimizar o tempo de avaliações e realizar mais tratamentos, levando em conta a disponibilidade das sementes apenas uma vez ao ano e por um curto período, cerca de três meses.

Segundo Oliveira et al., (2014), após padronizado para a espécie em estudo o teste de tetrazólio permite verificar a viabilidade das sementes rapidamente, com base na alteração da cor dos tecidos vivos, promovida pela ação da solução de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio.

GRÁFICO 2 – Grau de umidade, tetrazólio, emergência de plântulas e índice de velocidade de protrusão radicular de sementes de *A. angustifolia* criopreservadas em nitrogênio líquido e congeladas em ultrafreezer.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se pelo gráfico 2 e Imagens 3 e 4, que tanto a criopreservação em NL quanto o congelamento em ultrafreezer foram letais as sementes de *A. angustifolia*. Segundo Mendonça e Dias (2000), todas as sementes, seja ela ortodoxa ou recalcitrante, são susceptíveis aos danos causados pelas temperaturas abaixo de 0°C quando estas se encontram com elevado grau de umidade

O congelamento lento promove a formação de gelo no espaço intercelular previamente ao intracelular fazendo com que ocorra um desequilíbrio osmótico entre os meios e migração da água do interior da célula para o meio extracelular (SIMIONI, 1992). Dependendo da quantidade de água perdida pela célula esta pode perder a viabilidade por desidratação (TAIZ; ZEIGER, 2013). Por outro lado, embora o congelamento rápido minimize os efeitos da concentração de soluto a medida que o gelo se forma mais uniformemente dentro e fora da célula. Esta técnica favorece maior formação de gelo no interior da célula, uma vez que a água não migra para o meio externo, podendo causar sua ruptura (SIMIONI, 1992).

Deve-se levar em consideração que neste experimento as amêndoas não foram desidratadas e tampouco crioprotetidas antes da criopreservação e do congelamento. Se uma grande quantidade de água permanecer no interior das células danos devido a formação de cristais de gelo e recristalização durante o congelamento e descongelamento são normalmente letais (SIMIONI, 1992), podendo romper o endosperma e o embrião das sementes (Imagens 3A e B).

IMAGEM 3 - Danos causados após criopreservação em nitrogênio líquido.



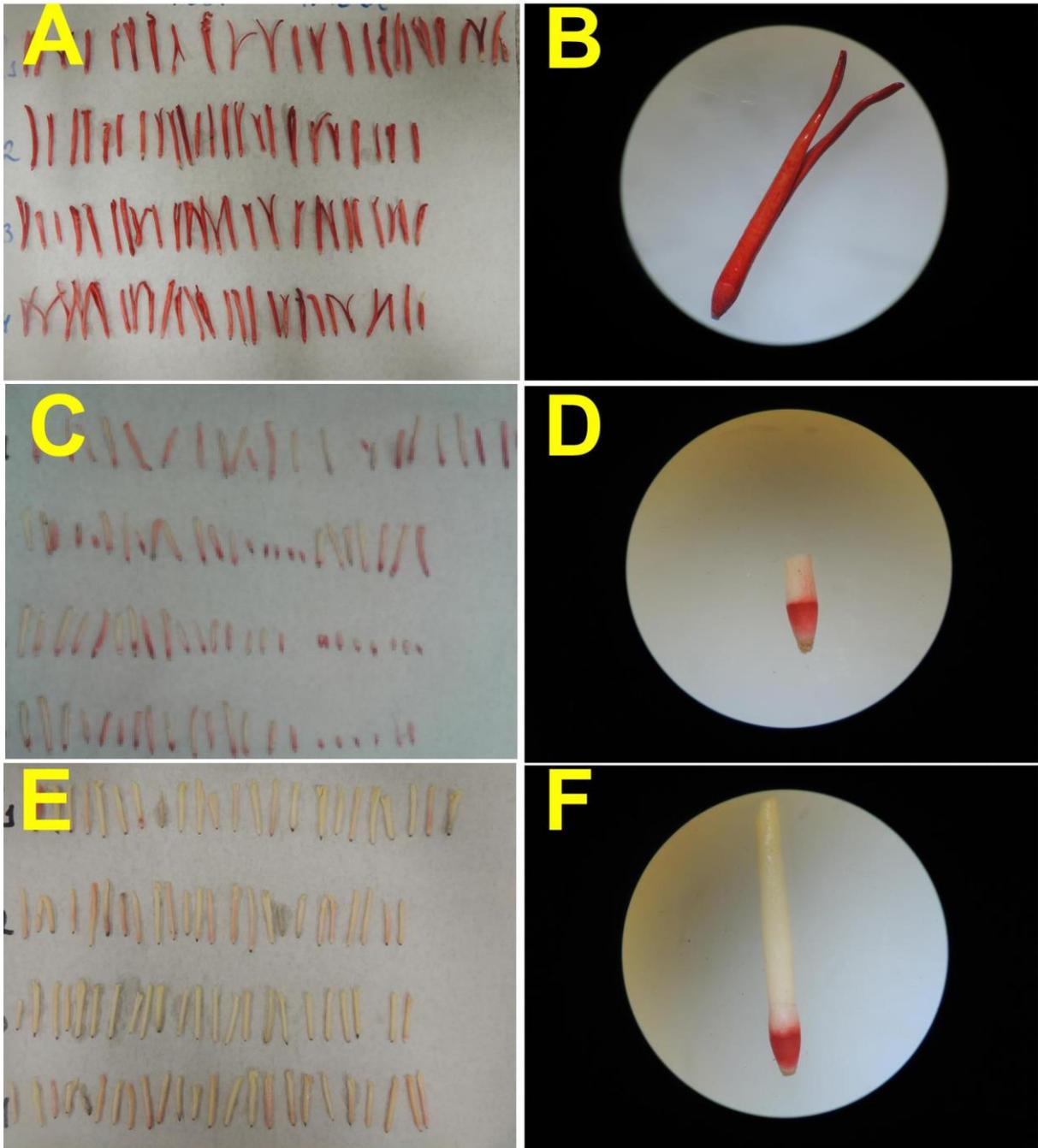
A e B – Amêndoas submetidas ao nitrogênio líquido e visivelmente rachadas, inclusive os embriões.

Diversos pesquisadores demonstraram a importância do teor de água nas sementes durante a criopreservação. Ao criopreservarem sementes recalcitrantes de chá (*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze) e de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.), Chandel et al. (1995) constataram que o teor de água adequado para crioconservação foi de 14% e que acima desse valor as sementes perderam sua capacidade germinativa. Sementes de alface foram danificadas ao serem crioconservadas com mais de 18% de umidade (Roos; Stanwood, 1981). Para Walters

et al., (2004) o conteúdo de umidade das sementes é um dos principais fatores que controlam a criopreservação.

Na imagem 4 visualiza-se o resultado do teste de tetrazólio realizado com os embriões de sementes de araucária após os tratamentos de congelamento. Nas imagens 4A e 4B (testemunha sem congelamento) a maioria (82%) dos embriões apresentaram coloração rósea, indicando viabilidade dos tecidos. Por outro lado, nas imagens 4C e 4D, após a criopreservação em nitrogênio líquido, os embriões apresentaram grande parte dos seus tecidos esbranquiçados, indicando ausência de respiração, portanto, morte dos embriões. O mesmo se observa nas imagens 4E e F, em que amêndoas congeladas em ultrafreezer também apresentaram embriões esbranquiçados.

IMAGEM 4 – Coloração em sal de tetrazólio de embriões de sementes de *A. angustifolia* criopreservados em nitrogênio líquido e congelados em ultrafreezer.



A – Testemunha, embriões coloridos em sal de tetrazólio; **B** – Embrião viável colorido em sal de tetrazólio e observado em estereoscópio; **C** – Embriões imersos em nitrogênio líquido e coloridos em sal de tetrazólio; **D** – Embrião inviável após imersão em nitrogênio líquido, colorido em sal de tetrazólio e observado em estereoscópio; **E** - Embriões congelados em ultrafreezer e coloridos em sal de tetrazólio e **F**- Embrião inviável após congelamento em ultrafreezer, colorido em sal de tetrazólio e observado em estereoscópio.

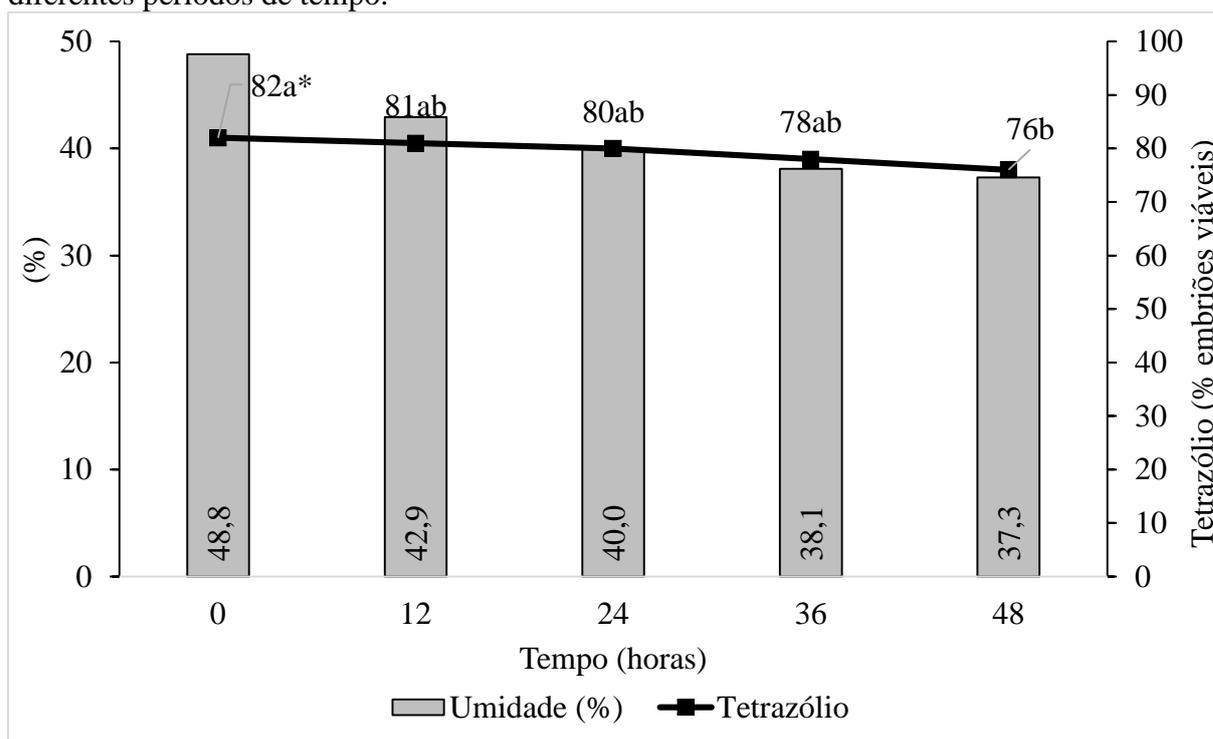
A criopreservação direta das amêndoas de *A. angustifolia* em nitrogênio líquido e o congelamento em ultrafreezer sem uma desidratação prévia e/ou utilização de solução crioprotetora que estabilize as membranas e vitrifique o citoplasma celular foi letal.

4.2 EXPERIMENTO II

Em função da constatação de que o alto grau de umidade das sementes foi o responsável pelo insucesso da criopreservação realizou-se o experimento II com o objetivo de se testar o efeito da solução de PVS2 (0,4 M de sacarose, 30% (v/v) de glicerol, 15% (v/v) de etilenoglicol e 15% (v/v) de DMSO) na viabilidade e redução do grau de umidade das sementes de *A. angustifolia*.

O grau de umidade inicial das amêndoas de *A. angustifolia* foi de 48,8% e a viabilidade, avaliada por meio do teste de tetrazólio, de 82% (Gráfico 3 e Imagem 5). A medida que o período de imersão das amêndoas na solução de PVS2 aumentou o grau de umidade das amêndoas e a viabilidade dos embriões reduziram, sendo o declínio na umidade mais pronunciado nas primeiras 12 horas de imersão.

GRÁFICO 3 – Umidade e viabilidade de sementes de *A. angustifolia* imersas em PVS2 por diferentes períodos de tempo.



*As médias de tetrazólio seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

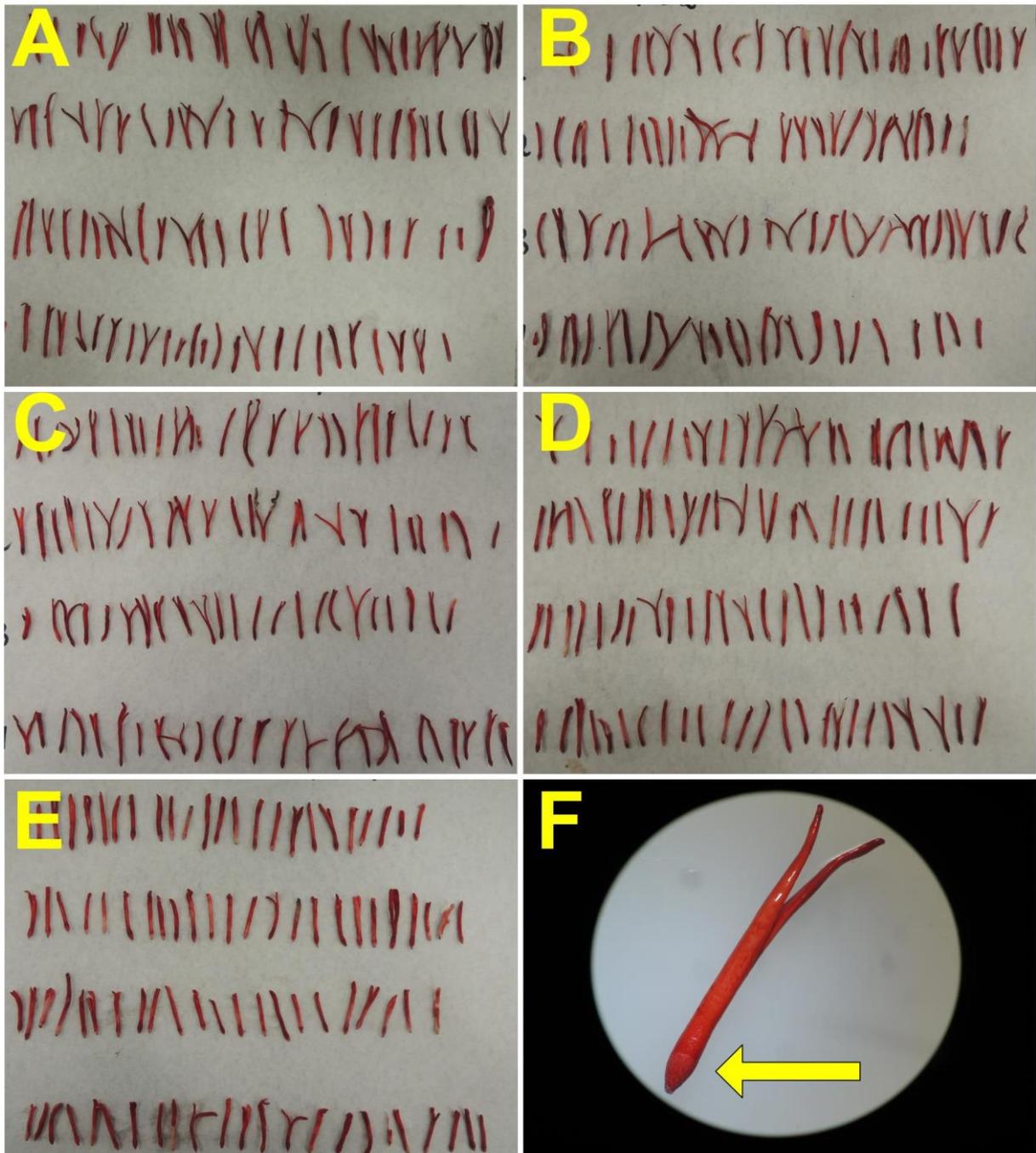
Fonte: Elaborado pelo autor.

A imersão em PVS2 por 12, 24 e 36 horas reduziu a viabilidade dos embriões em 1, 2 e 4 pontos percentuais, respectivamente, porém não diferenciando estatisticamente da porcentagem de viabilidade no tempo zero (82%). Houve redução significativa na viabilidade dos embriões apenas para o tratamento com 48 horas de imersão em PVS2, porém este não diferiu dos tratamentos de imersão por 12, 24 e 36 horas. Estes resultados indicam que a solução

de PVS2, quando utilizada por um período de até 36 horas, é eficiente em reduzir a umidade das amêndoas de *A. angustifolia* sem causar prejuízos a sua viabilidade.

Em trabalho de criopreservação com sementes de orquídea (*Dendrobium* sp.) Galdiano Júnior (2013) também verificou que longos períodos de imersão das sementes em solução de PVS2 eram prejudiciais a germinação, neste caso, o intervalo de tempo de imersão que proporcionou maior porcentagem de germinação foi entre 1 e 3 horas.

IMAGEM 5 – Coloração em sal de tetrazólio de embriões de sementes de *A. angustifolia* imersos em solução de PVS2 por diferentes períodos de tempo.



A – Testemunha, coloridos em sal de tetrazólio; **B** – Embriões com 12 horas de imersão em PVS2, coloridos em sal de tetrazólio; **C** – Embriões com 24 horas de imersão em PVS2, coloridos em sal de tetrazólio; **D** – Embriões

com 36 horas de imersão em PVS2, coloridos em sal de tetrazólio; **E** – Embriões com 48 horas de imersão em PVS2, coloridos em sal de tetrazólio e **F**- Eixo embrionário viável na extremidade inferior do embrião (indicado na seta) colorido em sal de tetrazólio e observado em estereoscópio.

Quando as amêndoas permaneceram por 36 e 48 horas no PVS2 o grau de umidade foi respectivamente 38,1% e 37,3%. Eira (1994) comenta que o grau de umidade letal para sementes de *A. angustifolia* sem tegumento (amêndoas) é de 38%, pois abaixo disso ocorre perda total da viabilidade. No entanto, é possível observar que com grau de umidade de 37,3% as amêndoas apresentavam uma alta viabilidade, 76% (Gráfico 3).

A literatura é controversa em relação ao grau de umidade crítica das sementes de *A. angustifolia*, variando de 36 a 38% (TOMPSETT, 1984; EIRA et al. 1984). Assim, a umidade obtida nos tratamentos do presente experimento parece estar acima daquela considerada crítica, justificando a manutenção da alta viabilidade dos embriões.

A desidratação causada pelo PVS2 é de fundamental importância para a realização da criopreservação, pois o grau de umidade é um fator determinante para evitar a formação de cristais de gelo nos espaços intercelulares e no citoplasma das células, visando garantir a sobrevivência do material vegetal. Para que a desidratação não seja demasiada a ponto de causar danos as sementes recalcitrantes, deve-se ajustar o tempo de imersão na solução PVS2, a qual também pode exercer efeito fitotóxico nas sementes (SAKAI; HIRAI; NIINO, 2008).

Desse modo, a redução na viabilidade dos embriões com o aumento do período de imersão das sementes na solução de PVS2 pode ser atribuída a redução de umidade, que é prejudicial as sementes recalcitrantes, ou ao efeito fitotóxico do produto às sementes.

Molina et al. (2006) verificaram que sementes de cebola criopreservadas apresentaram redução na qualidade fisiológica em função do uso de crioprotetores, provavelmente pela toxicidade e/ou estresse osmótico causado pelo produto utilizado.

Dentre as substâncias utilizadas como crioprotetores destacam-se o etilenoglicol e o dimetilsulfóxido por apresentarem uma capacidade de penetração, superior a do glicerol, e baixa toxicidade as células. Contudo, a eficiência destes crioprotetores pode variar em função da estrutura (célula ou tecido) a ser criopreservada, do tipo e concentração e tempo de exposição utilizado antes do processo de criopreservação (FULLER; PAYNTER, 2004).

O dimetilsulfóxido é considerado por muitos autores como essencial à criopreservação por apresentar baixa toxidez ou atoxidez (WUSTEMAN et al. 2008). Além disso, é capaz de interagir e combinar-se com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos e proteínas, sem alterar suas configurações moleculares de forma irreversível (CASTRO et al., 2011) e também

promover maior estabilidade da membrana celular, durante o processo de congelamento (RODRIGUES et al., 2001).

Assim, os resultados do experimento II indicam (Gráfico 3 e Imagem 5) que a solução de PVS2 é eficiente em reduzir a umidade das sementes de *A. angustifolia* sem prejudicar sua viabilidade quando realizada por um período de até 36 horas.

4.3 EXPERIMENTO III

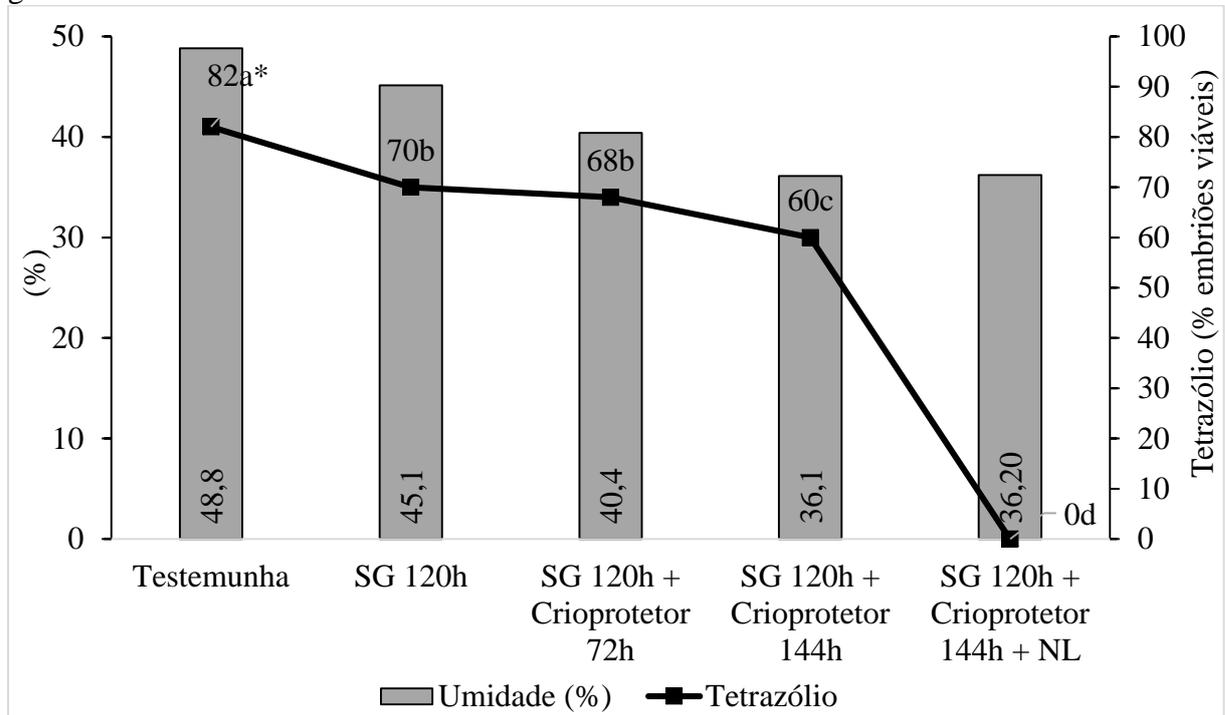
Ainda buscando alternativas para a desidratação e crioproteção das sementes de *A. angustifolia*, antes de proceder o congelamento, realizou-se o experimento III visando avaliar a influência da desidratação em sílica gel e posterior imersão das sementes em solução crioprotetora de glicose 60% + glicerol 15% sobre a viabilidade das sementes.

As amêndoas utilizadas no experimento III foram originárias do mesmo lote do experimento II, apresentando, portanto, a mesma porcentagem do grau de umidade e viabilidade, 48,8% e 82%, respectivamente.

De modo geral, nota-se no gráfico 4 a mesma tendência observada no gráfico 3, em que os embriões reduzem a viabilidade com a desidratação das amêndoas. Contudo, a desidratação em sílica gel por 120 horas reduziu o grau de umidade das amêndoas apenas 3,7 pontos percentuais, enquanto a redução na viabilidade dos embriões foi alta, 12 pontos percentuais. Este resultado evidencia que a solução de PVS2 é mais eficiente para promover a desidratação das sementes de *A. angustifolia* do que a sílica gel, visto que em PVS2 a semente perdeu maior umidade 5,9 pontos percentuais em menor período de tempo (12 horas) quando comparado ao tratamento com sílica gel e reduziu apenas 1 ponto percentual da viabilidade (Gráficos 3 e 4).

Observa-se ainda pelo gráfico 4 que o crioprotetor, glicose (60%) + glicerol (15%), quando utilizado por 72 horas, não prejudicou a qualidade fisiológica das sementes, entretanto, quando o período de imersão foi aumentado para 144 horas a viabilidade dos embriões reduziu em 22, 10 e 8 pontos percentuais em relação a testemunha, secagem em sílica gel e secagem em sílica gel + imersão em crioprotetor por 72 horas, respectivamente. Todavia, quando as amêndoas foram criopreservadas em nitrogênio líquido houve perda total da viabilidade dos embriões (Gráfico 4 e Imagem 6), indicando que a sequência de tratamentos utilizada no presente experimento (secagem e crioproteção) não foram eficientes para possibilitar a criopreservação de embriões de *A. angustifolia*, provavelmente, por não impedir a formação de cristais de gelo no interior das células (TAIZ; ZEIGER, 2013).

GRÁFICO 4 – Umidade e viabilidade de sementes de *A. angustifolia* submetidas a desidratação em sílica gel e imersas por diferentes períodos de tempo em crioprotetor de glicose 60% + glicerol 15%.

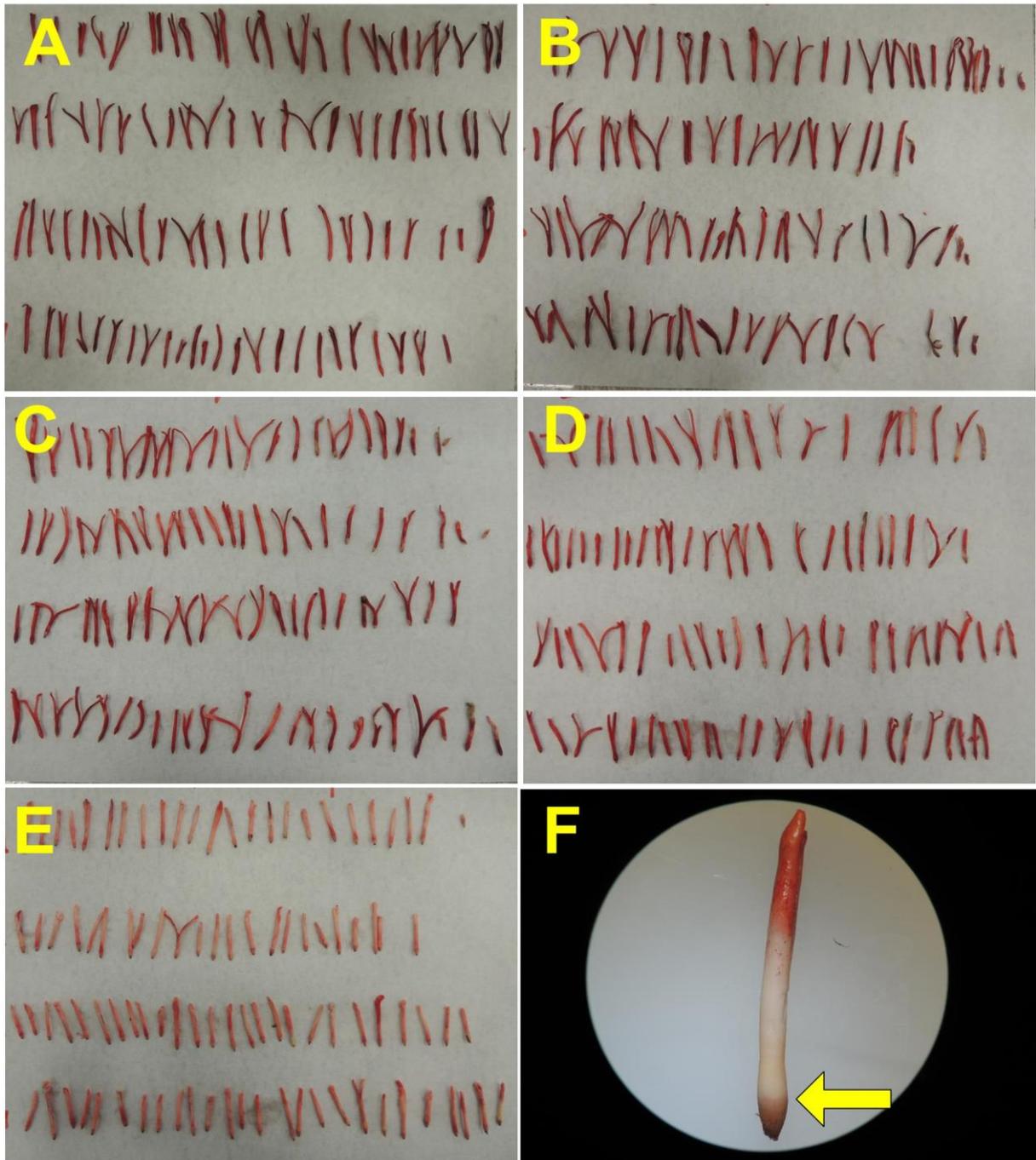


*As médias de tetrazólio seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na imagem 6 visualiza-se o resultado do teste de tetrazólio realizado com embriões de *A. angustifolia*. Nota-se que em 6A, B, C e D alguns dos embriões apresentaram coloração rósea, indicando a viabilidade dos tecidos. No entanto, nas imagens 6E e F observa-se que após a criopreservação os embriões ficaram brancos, indicando que os tecidos não estavam mais respirando e, portanto, estavam inviáveis. O teste de tetrazólio é uma ótima alternativa para a avaliação da viabilidade de sementes de espécie florestais que demoram para completar o processo germinativo, pois possibilita obter informações da qualidade fisiológica das sementes em prazos menores que 24 horas.

IMAGEM 6 – Coloração em sal de tetrazólio de embriões de sementes de *A. angustifolia* desidratados em sílica gel e imersos em crioprotetor de glicose 60% + glicerol 15% por diferentes períodos de tempo, depois criopreservados em nitrogênio líquido.



A – Testemunha, embriões coloridos em sal de tetrazólio; **B** – Embriões submetidos a desidratação por 120 horas em sílica gel, coloridos em sal de tetrazólio; **C** - Embriões submetidos a desidratação por 120 horas em sílica gel + 72 horas em crioprotetor de glicose 60% + glicerol 15%, coloridos em sal de tetrazólio; **D** - Embriões submetidos a desidratação por 120 horas em sílica gel + 144 horas em crioprotetor de glicose 60% + glicerol 15%, coloridos em sal de tetrazólio; **E** - Embriões submetidos a desidratação por 120 horas em sílica gel + 144 horas em crioprotetor de glicose 60% + glicerol 15% e criopreservados em nitrogênio líquido, coloridos em sal de tetrazólio e **F**- Eixo embrionário inviável na extremidade inferior do embrião (indicado na seta) colorido em sal de tetrazólio e observado em estereoscópio.

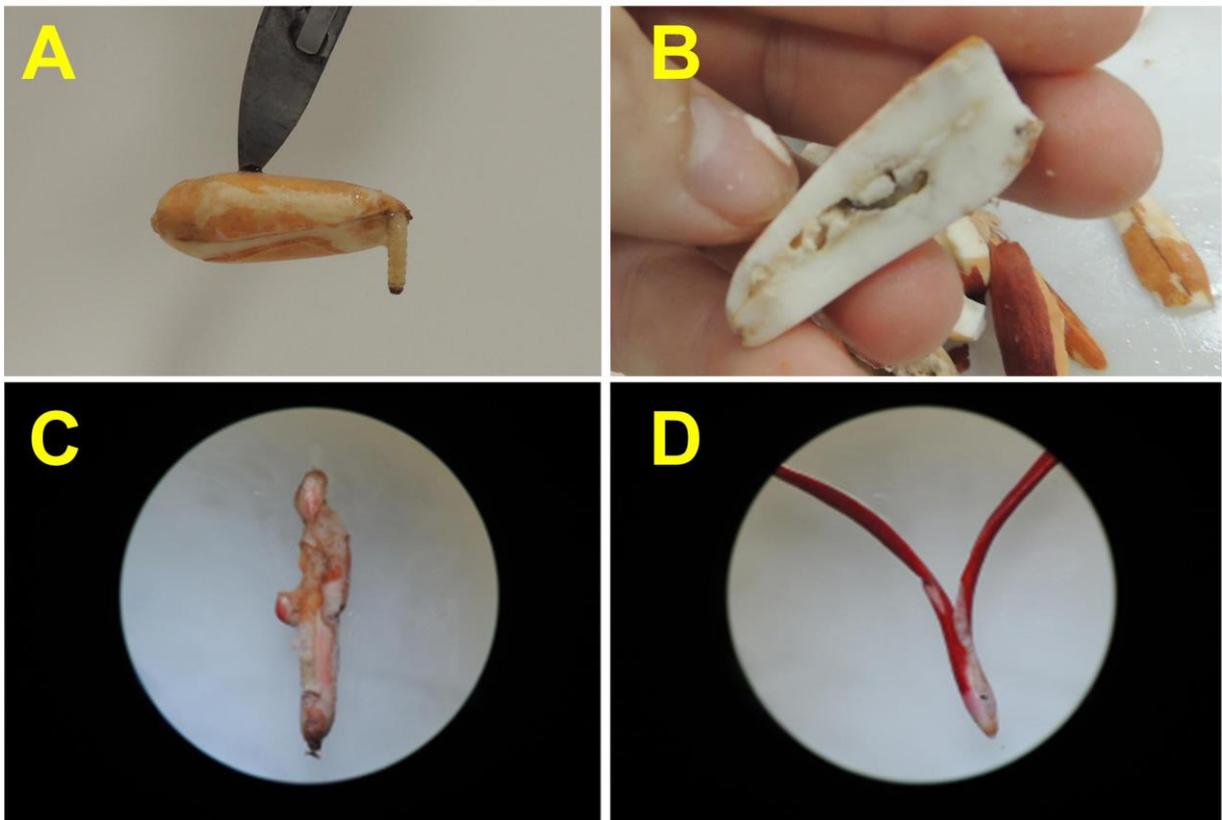
Ao comparar a imagem 6E (embriões submetidos a desidratação por 120 horas em sílica gel + 144 horas em crioprotetor de glicose 60% + glicerol 15% e criopreservados em nitrogênio

líquido) com as imagens 4C e 4E que correspondem ao congelamento em NL e UTF sem utilização de tratamento prévio ao congelamento, verifica-se que os embriões pré-tratados antes do congelamento apresentam diversos pontos com coloração rósea, indicando a existência de tecido vivo após o congelamento. Enquanto que, os embriões congelados sem pré tratamento apresentam coloração totalmente esbranquiçada, sinalizando a ausência de respiração no tecido.

Embora, haja evidências do benefício do pré tratamento das amêndoas de *A. angustifolia* antes do congelamento, este não foi suficiente para impedir danos ao eixo embrionário, o qual apresentou coloração escura, típica de oxidação, após o congelamento (Imagem 6F).

Outro fator que pode ter contribuído para a perda da viabilidade das sementes de *A. angustifolia*, principalmente no período que estava na sílica gel, foi o ataque de lagartas de *Cydia araucariaceae* observado no presente experimento (Imagem 7A). Estas lagartas de lepidóptera constroem galerias nas sementes danificando o embrião irreversivelmente (Imagem 7B, C e D) (CARVALHO, 2002). Santos (2014) também relatou problemas com a lagarta *C. araucariaceae* em trabalho de conservação de sementes de araucária.

IMAGEM 7 - Danos causados por *Cydia araucariaceae* na amêndoa e no embrião de *A. angustifolia*.



A e B– Larva de *Cydia araucariaceae* em galeria aberta na amêndoa de *A. angustifolia*; **C e D** – Dano de *Cydia araucariaceae* em embrião colorido pelo teste de tetrazólio, observado em estereoscópio.

4.4 EXPERIMENTO IV

Em virtude da eficiência da solução de PVS2 na desidratação das amêndoas de *A. angustifolia* sem afetar sua qualidade fisiológica (Experimento II; Gráfico 3), realizou-se o experimento IV com objetivo de avaliar se o PVS2, aplicado antes do congelamento, preserva a qualidade fisiológica das sementes após o congelamento.

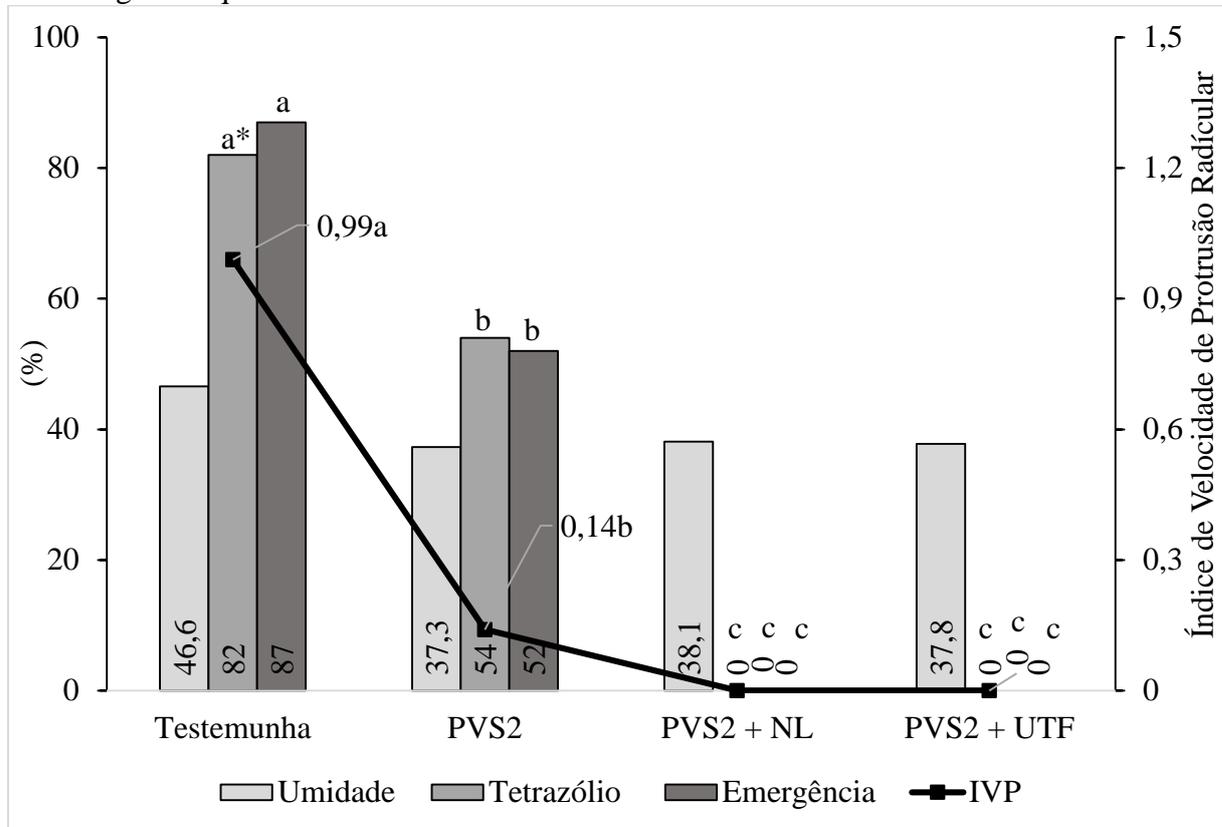
A escolha do tempo de imersão em PVS2 por 48 horas, mesmo sendo o período de tempo que mais prejudicou a qualidade fisiológica das sementes (experimento II; Gráfico 3), deveu-se ao fato de que foi o período de tempo necessário para que as sementes atingissem o grau de umidade mais próximo do crítico, 37% (TOMPSETT, 1984). Acreditava-se que grau de umidade superior ao crítico fosse mais prejudicial para o congelamento do que o aumento no período de imersão das sementes em PVS2.

Ao observar o gráfico 5 nota-se que a imersão das amêndoas em PVS2 por 48 horas foi eficiente em reduzir o grau de umidade até valor próximo daquele considerado crítico para as sementes de *A. angustifolia*, 37% (TOMPSETT, 1984). Após permanecerem por 48 no PVS2 a umidade das amêndoas decresceu de 46,6 para 37,3%, valor parecidos aos observados no experimento II (Gráfico 3).

Com tudo, este período de imersão afetou negativamente a qualidade fisiológica das sementes, reduzindo a viabilidade medida pelo teste de tetrazólio em 28 pontos percentuais, a porcentagem de emergência de plântulas em 35 pontos percentuais e o índice de velocidade de protrusão radicular que variou de 0,99 para 0,14. Este resultado difere do observado no experimento II, em que após a imersão das amêndoas por 48 horas no PVS2 a viabilidade das sementes havia declinado apenas 6 pontos percentuais em relação a testemunha.

Mais uma vez o teste de tetrazólio se mostrou eficiente em medir a viabilidade das sementes de *A. angustifolia*, apresentando valor muito similar ao observado no teste de emergência de plântulas (Gráfico 5 e Imagem 8 A, B, C e D). Segundo Vieira e Von Pinho (1999), uma das principais vantagens do teste de tetrazólio é a possibilidade de avaliar a qualidade fisiológica das sementes de maneira rápida e eficiente.

GRÁFICO 5 – Umidade, tetrazólio, emergência de plântulas e IVP de sementes de *A. angustifolia* imersas em PVS2 e posteriormente congeladas em ultrafreezer e criopreservadas em nitrogênio líquido.



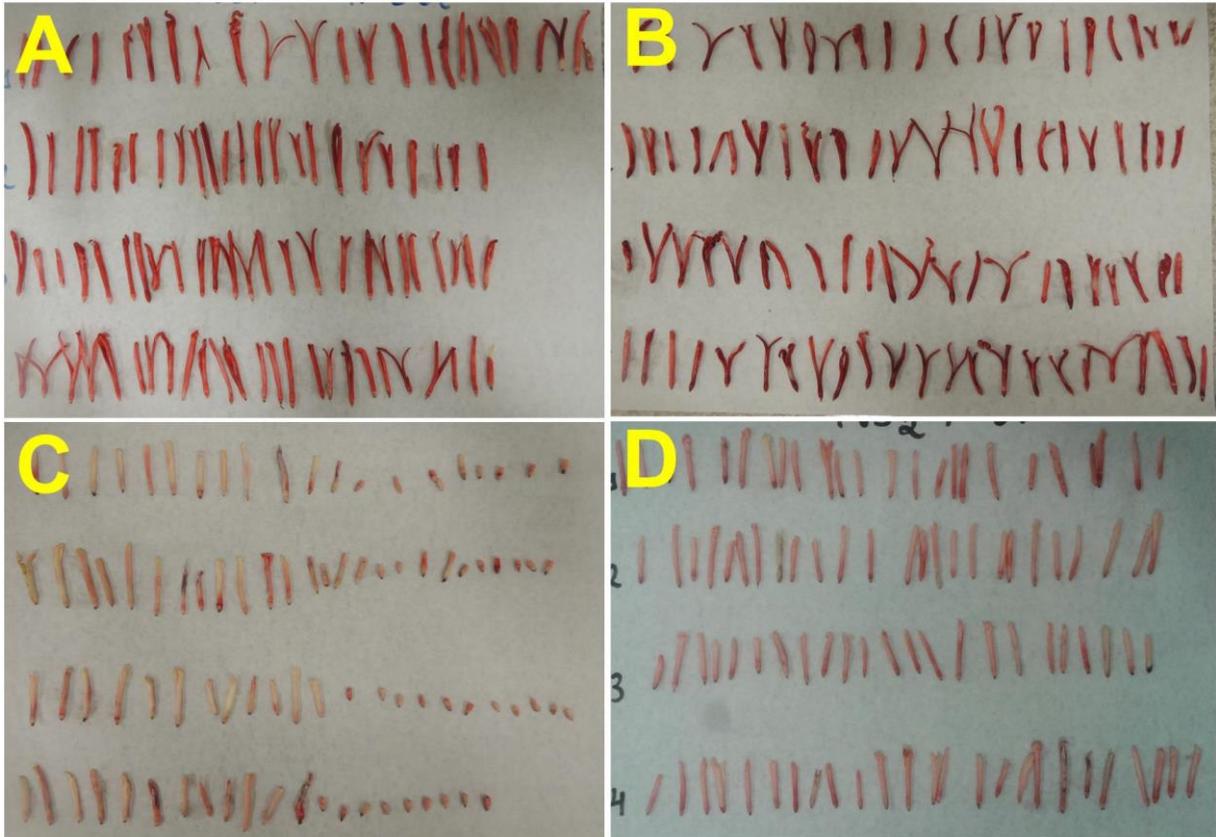
*As médias de tetrazólio, emergência e IVP seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O congelamento das amêndoas tanto em ultrafreezer quanto a criopreservação em nitrogênio líquido não alterou o grau de umidade das sementes, o qual permaneceu ao redor de 38%. No entanto, foi letal as sementes, reduzindo à zero sua viabilidade mesmo quando crioprotetidas com PVS2 (Gráfico 5).

Observa-se pela imagem 8 C um grande número de embriões quebrados, uma possível causa para isto pode ter sido a utilização do papel alumínio envolvendo as amêndoas durante o período de congelamento, potencializando a velocidade de congelamento e favorecendo a formação de cristais de gelo no interior das células, os quais podem causar sua ruptura. Apesar da utilização de PVS2, parece que a umidade ainda é muito alta para a criopreservação em nitrogênio, rupturas semelhantes observa-se na imagem 4C e D, onde não tinha sido realizada nenhuma forma de desidratação e crioproteção.

IMAGEM 8 – Coloração em sal de tetrazólio de embriões de sementes de *A. angustifolia* imersos em PVS2 e depois criopreservados em nitrogênio líquido e congelados em ultrafreezer.



A – Testemunha, embriões coloridos em sal de tetrazólio; **B** – Avaliação depois de 48 horas em PVS2, embriões coloridos em sal de tetrazólio; **C** - Embriões imersos em nitrogênio líquido depois do PVS2 e colorido em sal de tetrazólio; **D** - Embriões congelados em ultrafreezer depois do PVS2 e colorido em sal de tetrazólio.

Pela imagem 8A (testemunha) nota-se que os embriões estão com coloração rózea, indicativo de que estão viáveis e respirando normalmente. Por outro lado, quando as amêndoas foram tratadas com PVS2 (Imagem 8B) nota-se uma coloração mais escurecida indicando aumento respiratório em função de algum estresse, provavelmente a presença de PVS2 para a desidratação das sementes.

O etilenoglicol (componente do PVS2) é um álcool de fórmula molecular $C_2H_4(OH)_2$, devido às suas características de baixo peso molecular (62,07 g/mol) e baixo ponto de fusão ($-15,6^{\circ}C$), tem sido amplamente empregado como agente crioprotetor intracelular, todavia, a metabolização desse crioprotetor gera subprodutos potencialmente tóxicos, como o ácido glicólico e oxalato (CORLEY et al.,2005). Já o dimetilsulfóxido (DMSO), outro componente do PVS2, é um álcool dipolar de formula química C_2H_6SO , é caracterizado por possuir peso molecular de 78 g/mol e temperatura de congelação de $18,5^{\circ}C$. Essa substância é considerada relativamente atóxica (WUSTEMAN et al., 2008).

O glicerol, ou 1,2,3-propanotriol ($C_3H_8O_3$) por ser um constituinte normal presente nas membranas celulares e em todos os óleos e gorduras animal e vegetal, todas as células são capazes de metabolizar o glicerol, não havendo informações toxicológicas referentes ao mesmo, ou sua forma comercial, glicerina. Porém, vale ressaltar que a toxicidade biológica dos agentes crioprotetores está diretamente relacionada às suas respectivas concentrações (CORLEY et al.,2005).

Trabalhando com 3 espécies da família Amaryllidaceae: *Zephyranthes robusta*, *Hippeastrum papilio* e *Hippeastrum glaucescens*, conhecidos por lírios da chuva, Tombolato et al. (2009), verificaram efeito negativo do PVS2, nas três espécies estudadas, quando utilizado como crioprotetor, antes do congelamento.

Pela imagem 9 observa-se que as amêndoas se apresentam com aspecto gelatinoso após permanecer por 48 horas em PVS2 e serem criopreservadas em nitrogênio líquido. Ressalta-se que diversas amêndoas apresentaram este aspecto, possivelmente pela penetração de alguns componentes do PVS2 nas células e posterior ruptura da membrana celular com a criopreservação, ocorrendo o extravasamento do conteúdo celular, o qual reagiu com os componentes da solução adquirindo este aspecto.

IMAGEM 9 – Emergência de plântulas de *A. angustifolia* após 48 horas de imersão em PVS2 e criopreservação em nitrogênio líquido.



Emergência após 48 horas de PVS2 e criopreservação em nitrogênio líquido.

Outro fator que pode ter contribuído para a formação desse aspecto gelatinoso das amêndoas de *A. angustifolia* (Imagem 9), pode ter sido a limitação de oxigênio, pois, apesar da solução de PVS2 ter sido aerada com bomba de aquário durante a imersão das amêndoas, esta solução apresentava alta viscosidade.

As sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl) podem ser previamente desidratadas a 4,2% de umidade e, posteriormente, imersas em nitrogênio líquido por, pelo menos, 360 dias, sem redução na qualidade fisiológica (MARTINS et al., 2009). Da mesma maneira, sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engl.) desidratadas até 6% podem ser imersas diretamente em nitrogênio líquido e conservadas pelo método de criopreservação (MEDEIROS; CAVALLARI, 1992).

O que difere a *A. angustifolia* das espécies supracitadas é seu comportamento recalcitrante que não permite que as sementes sejam desidratadas à conteúdo de água adequado para o sucesso da criopreservação. Assim, estudos que envolvam formas de desidratação de sementes menos agressivas e a utilização de crioprotetores eficientes em manter o balanço osmótico das células e estabilização das membranas são de fundamental importância para o êxito da técnica.

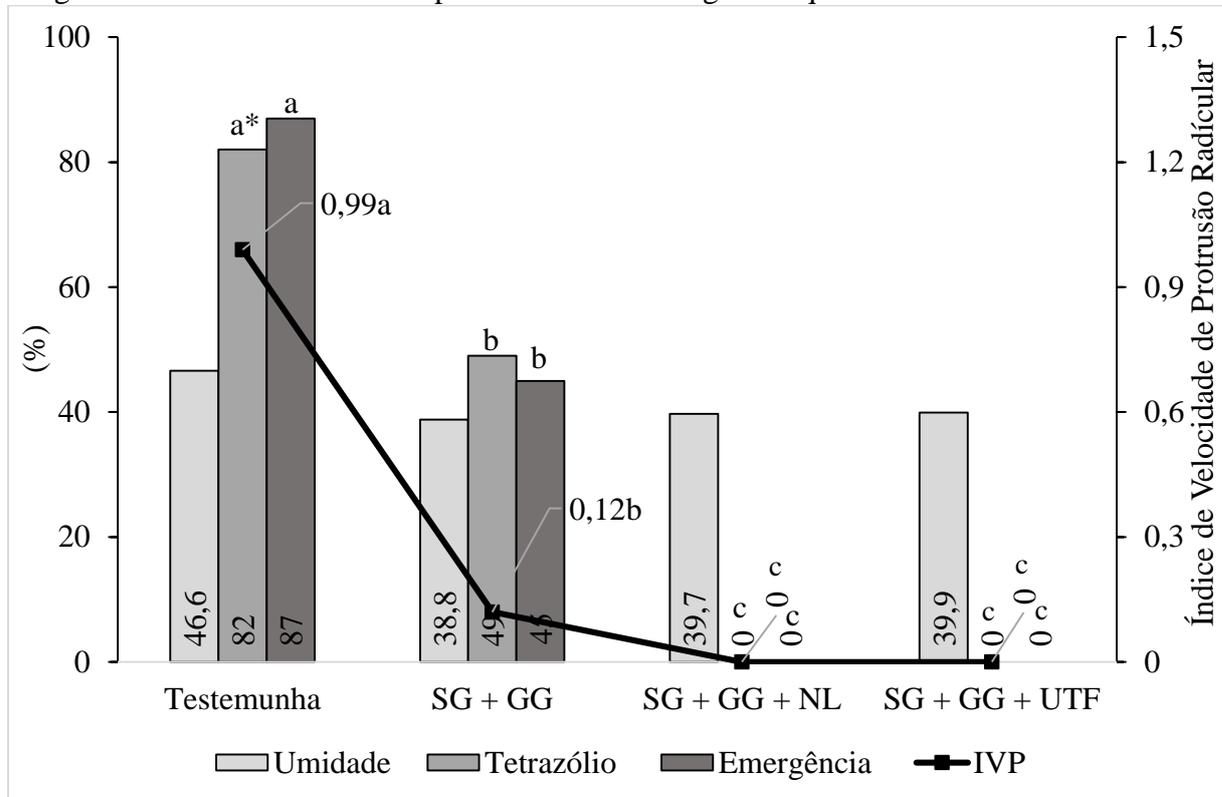
As injúrias causadas pelo congelamento são complexas, podendo ocorrer devido à desidratação excessiva ou à formação de gelo dentro das células (SIMIONI, 1992). Nestes casos ocorrerá rompimento das membranas, concentração de soluto no citoplasma a níveis tóxicos e desnaturação de ácidos nucléicos e membranas. A formação de gelo e as injúrias a ele associadas ocorrem de modo diferente dependendo da espécie da planta, estado de tolerância e as condições de congelamento (ALMEIDA et al., 2010).

4.5 EXPERIMENTO V

Em busca de alternativa menos agressiva para a desidratação e crioproteção de amêndoas de araucária do que a imersão em PVS2, objetivou-se com o experimento V avaliar a influência da desidratação em sílica gel e da crioproteção em glicose 60% + glicerol 15%, antes do congelamento, sobre a qualidade fisiológica de amêndoas de araucária.

Analisando o gráfico 6, percebe-se que o grau de umidade das amêndoas, após permanecerem 48 horas em sílica gel mais 120 horas em solução de glicose 60% + glicerol 15%, caiu de 46,6 para 38,8%. Embora o grau de água das sementes não tenha reduzido abaixo do considerado crítico 37% (TOMPSETT, 1984); a qualidade fisiológica das sementes reduziu consideravelmente com os tratamentos de desidratação e crioproteção. A emergência de plântulas reduziu 42 pontos percentuais e a viabilidade avaliada pelo teste de tetrazólio caiu 33 pontos percentuais.

GRÁFICO 6 - Umidade, tetrazólio, emergência de plântulas e IVP de sementes *A. angustifolia* submetidas a sílica gel e imersas em solução glicose 60% + glicerol 15%, posteriormente congeladas em ultrafreezer e criopreservadas em nitrogênio líquido.



*As médias de tetrazólio, emergência e IVP seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Trabalho realizado por Rego (2012) mostra a importância da umidade nas sementes recalcitrantes. Sementes de *Blepharocalyx Salicifolius* com 37% de umidade inicial e 93% de germinação quando desidratadas em solução salina saturada de acetato de potássio para 29% de umidade a germinação diminuiu para 85% e com 25% de umidade para 60% de germinação. Quando as sementes atingiram 14% de umidade a germinação foi nula. Redução na viabilidade com o aumento na desidratação das sementes também foi verificado para a espécie recalcitrante *Casearia decandra* (REGO, 2012).

O conteúdo de umidade das sementes é um dos principais fatores que controlam a criopreservação (WALTERS et al., 2004). Como as amêndoas apresentavam alta umidade nos dois tipos de congelamento, cerca de 39% (Gráfico 6), sugere-se que tenha ocorrido formação de cristais de gelo intra e extracelular ocasionando a morte das células.

Além disso, considerando que as sementes possuem água livre, facilmente removida por meio da secagem, e água de constituição, fortemente associada às macromoléculas, a desidratação acentuada das sementes recalcitrantes retira não só a água livre, mas parte da água de constituição, resultando na perda da estabilidade dos componentes subcelulares, inclusive

membranas. Isto levaria à perda de integridade do plasmalema, tonoplasto e outras membranas e, conseqüentemente, à perda da viabilidade das sementes (BERJAK et al., 1984).

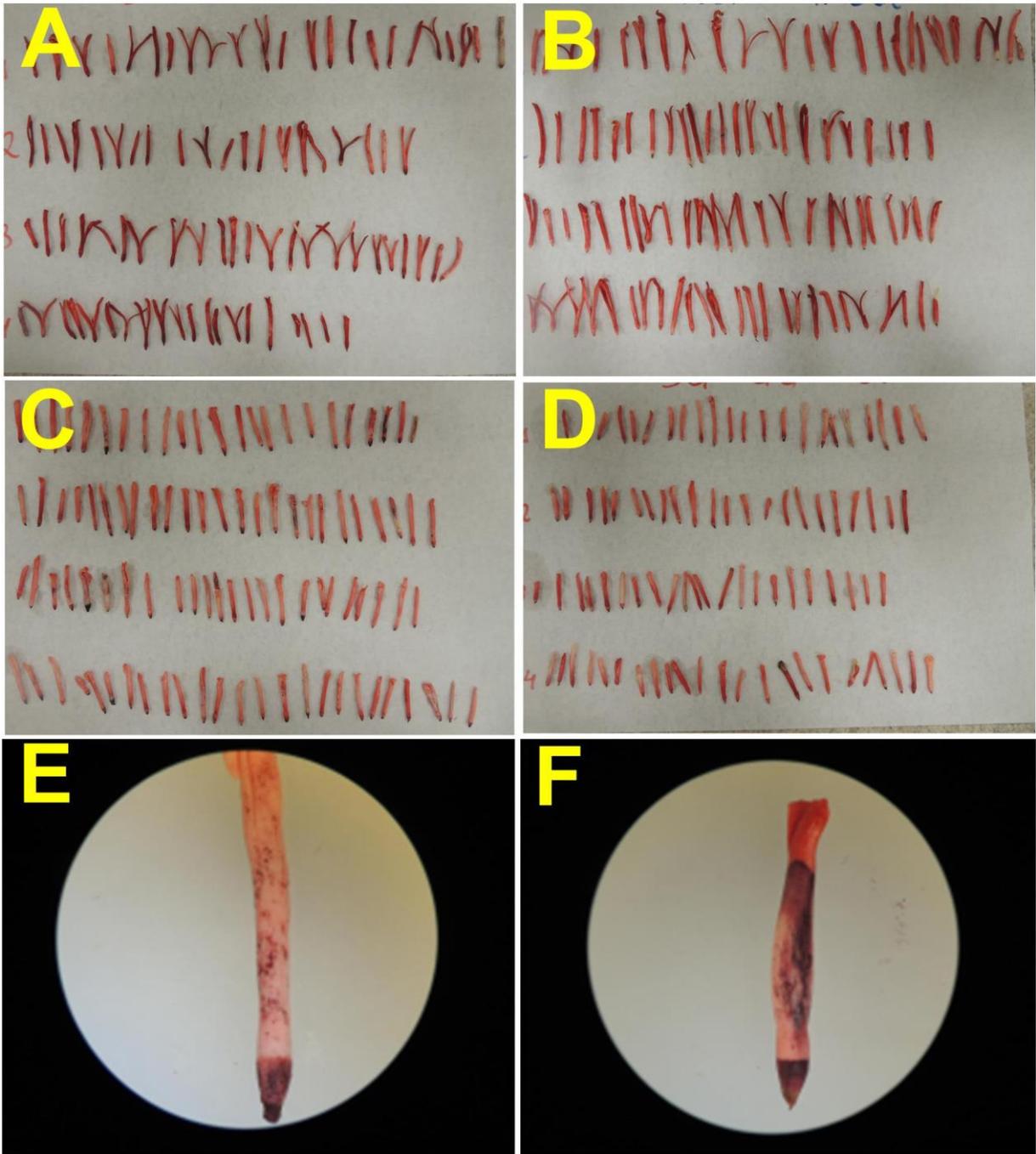
Embora o crioprotetor utilizado tenha sido eficiente em reduzir a umidade das amêndoas de araucária, este apresentou efeito fitotóxico, reduzindo a viabilidade das amêndoas em 33% (teste de tetrazólio) e 42% (teste de emergência) em comparação a testemunha. Quando as amêndoas foram congeladas não houve emergência (Gráfico 6).

Ao comparar os gráficos 5 e 6 nota-se que a solução de PVS2 foi mais eficiente do que a desidratação em sílica gel + 120 horas de imersão em glicose 60% + glicerol 15%, visto que a primeira reduziu a umidade em menor período de tempo e causou menor fitotoxidade as amêndoas de *A. angustifolia*.

A imagem 10 mostra o resultado do teste de tetrazólio em embriões de sementes de araucária. Observa-se que a testemunha apresentou 82% de viabilidade (imagem 10A) e após a desidratação em sílica gel por 48 horas e crioproteção em glicose 60% + glicerol 15% por 120 horas a viabilidade diminuiu para 49% (imagem 10B). Sugere-se que a queda na viabilidade dos embriões após o tratamento com a solução crioprotetora tenha ocorrido em função do efeito fitotóxico desta sobre as sementes e em virtude do ataque de *C. araucariaceae* no período de desidratação em sílica gel (Imagem 11).

Existe uma correlação entre a viabilidade das sementes e a atividade das desidrogenases, que estão relacionadas com a atividade respiratória da semente, e nela se baseia o teste de tetrazólio (POPINIGIS, 1977). Este teste é atualmente, o melhor teste bioquímico para avaliar a viabilidade de sementes. A respiração é um processo influenciado pela atividade de um grupo de enzimas que agem como catalisadores da decomposição de substâncias de reserva. À medida que, as sementes deterioram, a respiração se torna gradativamente menos intensa e tem como consequência final o colapso metabólico da semente (MARCOS FILHO, 2005).

IMAGEM 10 – Coloração em sal de tetrazólio de embriões de sementes de *A. angustifolia* desidratados e crioprottegidos em sílica gel + solução de glicerol 15% e glicose 60% e depois criopreservados em nitrogênio líquido e congelados em ultrafreezer.



A – Testemunha, embriões coloridos em sal de tetrazólio; **B** – Embriões desidratados e crioprottegidos em sílica gel + solução de glicerol 15% e glicose 60%, coloridos em sal de tetrazólio; **C** – Embriões desidratados e crioprottegidos em sílica gel + solução de glicerol 15% e glicose 60%, criopreservados em nitrogênio líquido e coloridos em sal de tetrazólio; **D** - Embriões desidratados e crioprottegidos em sílica gel + solução de glicerol 15% e glicose 60%, congelados em ultrafreezer e coloridos em sal de tetrazólio; **E** – Embrião inviável criopreservado em nitrogênio líquido e colorido em sal de tetrazólio, observado em estereoscópio e **F**- Embrião inviável após congelamento em ultrafreezer, colorido em sal de tetrazólio e observado em estereoscópio.

As imagens 10C e 10D mostram embriões inviáveis após as duas formas de congelamento, porém pode-se verificar que partes do tecido apresentam coloração rósea,

indicativo de que está havendo respiração. Todavia, quando as imagens são ampliadas (Imagens 10E e 10F) observa-se danos ao eixo embrionário, que apresenta coloração escura característica de oxidação. Assim, embora a solução crioprotetora demonstre ter reduzido os danos do congelamento, esta não foi eficiente em preservar o eixo embrionário.

Marin e Duran (1988), quando criopreservaram embriões somáticos de laranja (*Citrus sinensis*) observaram a ocorrência de oxidação. Os embriões apresentaram uma coloração marrom e não mostraram qualquer desenvolvimento até um período de 34-65 dias após o congelamento em NL. Após este período, alguns embriões desenvolveram manchas verdes que se transformaram em novos embriões, pseudobulbos e calos.

Geralmente, as sementes recalcitrantes são grandes e, por isso, apresentam elevada quantidade de água a ser retirada, a perda de água congelável é lenta, o que deixa as sementes expostas por mais tempo à ação de radicais livres deletérios gerados pela própria perda de água (BERJAK; PAMMENTER, 2001). Como as sementes recalcitrantes possuem mecanismos antioxidantes pouco eficientes, sua viabilidade é comprometida, sendo assim, a mínima remoção de água deve ser rápida (BERJAK; PAMMENTER, 2001).

Quando uma velocidade controlada de resfriamento é aplicada às células, em primeiro lugar forma-se o gelo extracelular e um gradiente de água diferencial é criado através da membrana celular e intracelular. A água se move para o lado de fora e a quantidade de água disponível para formar cristais de gelo se torna reduzida. Se o resfriamento é muito lento, os solutos das células tornam-se excessivamente concentrados, o que causa danos devido à altas concentrações dos solutos (SANTOS, 2001). Esta pode ter sido a causa da perda de viabilidade dos embriões de *A. angustifolia* no congelamento em ultrafreezer.

Por outro lado, a imersão direta de material vegetal em NL ou resfriamento rápido induz o congelamento intracelular mais cedo no processo, o que evita a desidratação celular. Segundo Withers e Williams (1998), os cristais de gelo que se formam dentro da célula são muito pequenos e não causam danos. Desta maneira, é recomendado que embriões com alto teor de água sejam congelados rapidamente, pois teriam maiores chances de sobreviver a criopreservação. Entretanto, esta técnica não foi eficiente no presente experimento.

IMAGEM 11 – Amêndoas de *A. angustifolia* em sílica gel.



A – Amêndoas de *A. angustifolia* em sílica gel; **B** – Ataque de larvas de *Cydia araucariaceae* nas amêndoas em sílica gel.

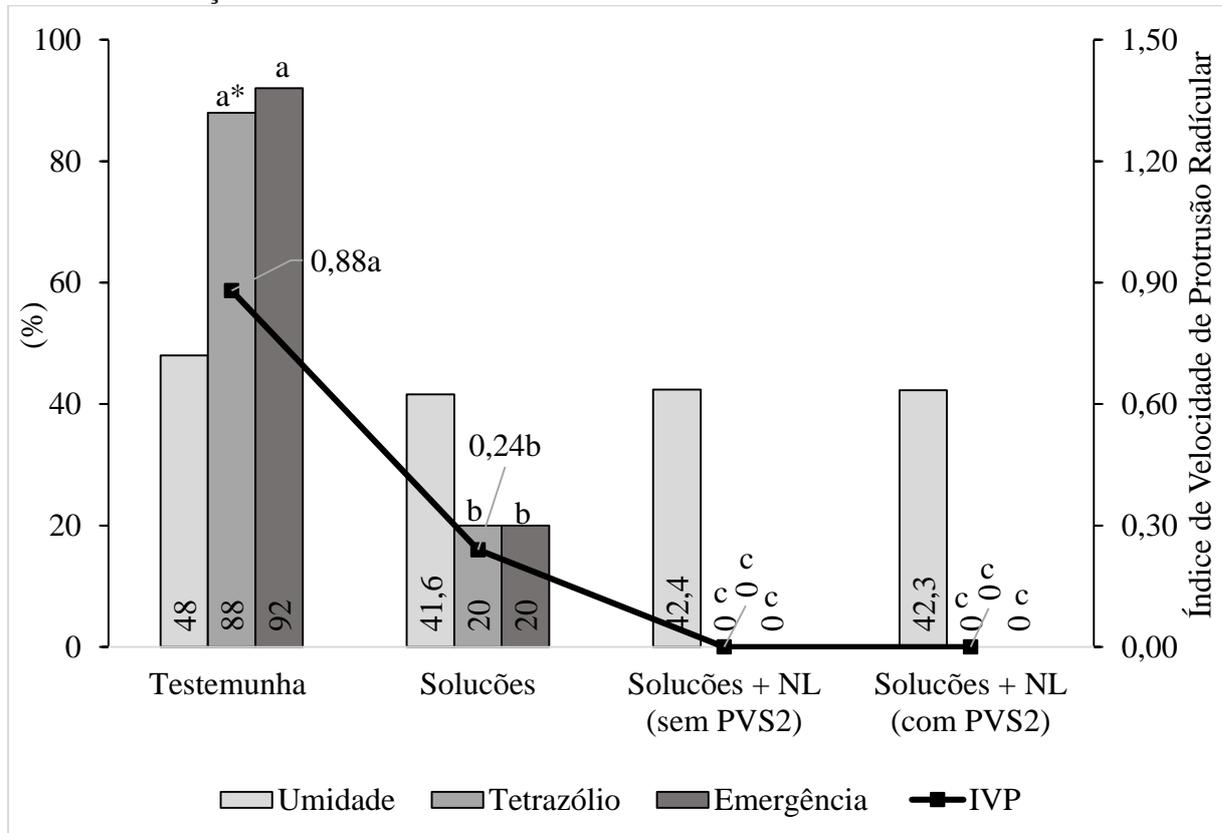
4.6 EXPERIMENTO VI

Em função da constatação de fitotoxicidade quando da imersão direta das amêndoas de araucária em solução de PVS2 (experimento IV) objetivou-se no experimento VI testar a pré aclimação das amêndoas antes da imersão em PVS2 e do congelamento.

Verifica-se pelo gráfico 7 que as amêndoas apresentavam grau de umidade inicial de 48% e a viabilidade medida pelo teste de tetrazólio e emergência foram 88 e 92% respectivamente.

Após a aclimação das amêndoas por 24 horas em solução com 3M de sacarose mais 12 horas em solução com 2M de glicose + 0,4M de sacarose e posterior imersão em PVS2 por 24 horas a umidade caiu 6,4 pontos percentuais, chegando a 41,6%. Embora o grau de umidade atingido pelas amêndoas esteja bem acima do considerado crítico, 37% (TOMPSETT, 1984), notou-se drástica redução na viabilidade das sementes em ambos os testes, emergência e tetrazólio, com valor de 20% para os dois testes. O vigor das sementes também foi prejudicado reduzindo o IVP de 0,88 para 0,24. (Gráfico 7).

GRÁFICO 7 - Umidade, tetrazólio, emergência de plântulas e IVP de sementes de *A. angustifolia* imersas em crioprotetores e posteriormente criopreservadas em nitrogênio líquido com e sem solução de PVS2.



*As médias de tetrazólio, emergência e IVP seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma possível explicação para a redução da viabilidade e do vigor das sementes imersas em PVS2 mesmo com a pré aclimação foi a utilização de uma bomba de vácuo por dois minutos a cada troca de solução, a qual forçou entrada de solutos nas células e espaços intercelular, o que pode ter afetado a fisiologia normal da célula.

Segundo Borges et al. (2006), a estabilidade e a manutenção da estrutura das membranas celulares são fundamentais para a semente suportar a dessecação e, conseqüentemente, manter o seu vigor durante o armazenamento.

Em sementes de algumas espécies, principalmente de Leguminosae, ocorre acúmulo de ciclitóis livres e, principalmente, ciclitóis galactosilados. Estes, juntamente com a sacarose, poderiam contribuir para a estabilidade estrutural de organelas, membranas, enzimas e outras macromoléculas e para a formação do estado vítreo, fundamental na tolerância das sementes à dessecação (OBENDORF, 1997).

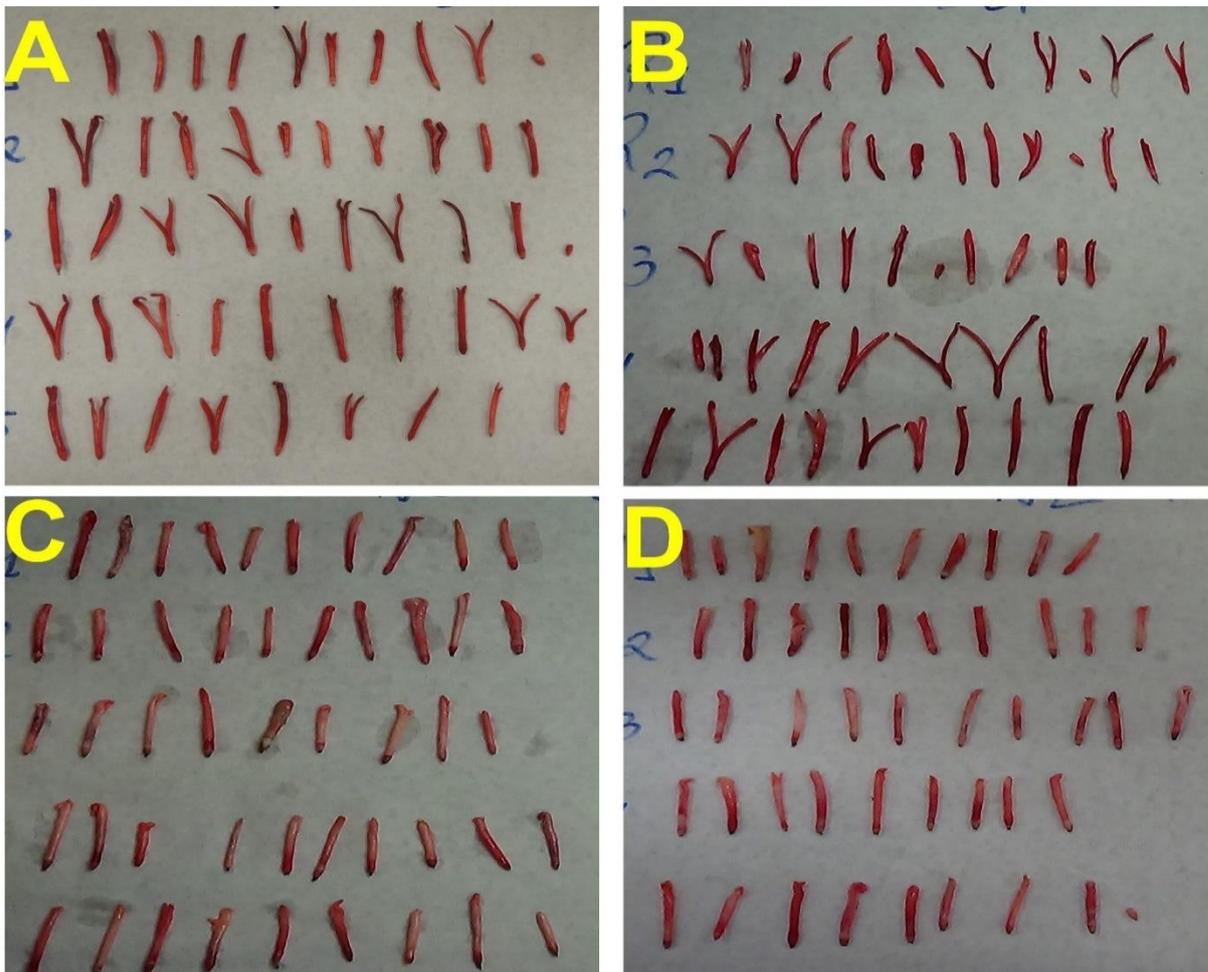
A sacarose como agente osmoprotetor em sementes, poderia auxiliar na estabilização das membranas, além de atuar como fonte de carbono e energia, regulador do potencial

osmótico das células, sinalizador de processos biológicos, substrato para síntese de enzimas que participam no processo germinativo da semente, regulador de morfogênese entre outros, limitando os danos causados pela dessecação (BUCKERIDGE et al. 2000).

Na imagem 12 verifica-se que após os tratamentos de pré aclimatação e PVS2 por 24 horas houve redução na viabilidade dos embriões de *A. angustifolia*, a qual passou de 88% (imagem 12A), maioria dos embriões e eixos embrionários com coloração rósea, para 20% (imagem 12B), embriões e eixo embrionário escurecidos, indicando deterioração dos tecidos.

Observa-se ainda nas imagens 12 C e 12 D, que apesar da criopreservação em nitrogênio líquido ter sido letal aos embriões, parte dos tecidos destes ainda respiravam, diferentemente do observado no experimento I (Imagens 4 C e 4E), em que os embriões ficaram esbranquiçados. Este resultado indica avanços na técnica de criopreservação de sementes de *A. angustifolia*, entretanto, novos estudos devem ser realizados visando minimizar a oxidação do eixo embrionário.

IMAGEM 12 – Coloração em sal de tetrazólio de embriões de sementes *A. angustifolia* crioprotetidos e posteriormente criopreservados em nitrogênio líquido com e sem solução de PVS2.



A – Testemunha, embriões coloridos em sal de tetrazólio; **B** – Embriões depois dos crioprotetores, coloridos em sal de tetrazólio; **C** – Embriões depois dos crioprotetores, criopreservados em nitrogênio líquido sem PVS2 e

coloridos em sal de tetrazólio; **D** – Embriões depois dos crioprotetores, criopreservados em nitrogênio líquido com PVS2 e coloridos em sal de tetrazólio.

A utilização do PVS2 junto ao congelamento teve intuito de promover a vitrificação intracelular, extracelular e do entorno das amêndoas, buscando minimizar os danos do congelamento. A vitrificação consiste em um processo através do qual a água sofre uma transição da fase líquida para um estado sólido amorfo e meta-estável, o sólido assim formado é na verdade uma solução supersaturada de alta viscosidade (SANTOS, 2000). Nessa condição, as chances de formação cristais de gelo intracelular são menores, mantendo órgãos e tecidos vegetais vitrificados íntegros à temperatura do nitrogênio líquido.

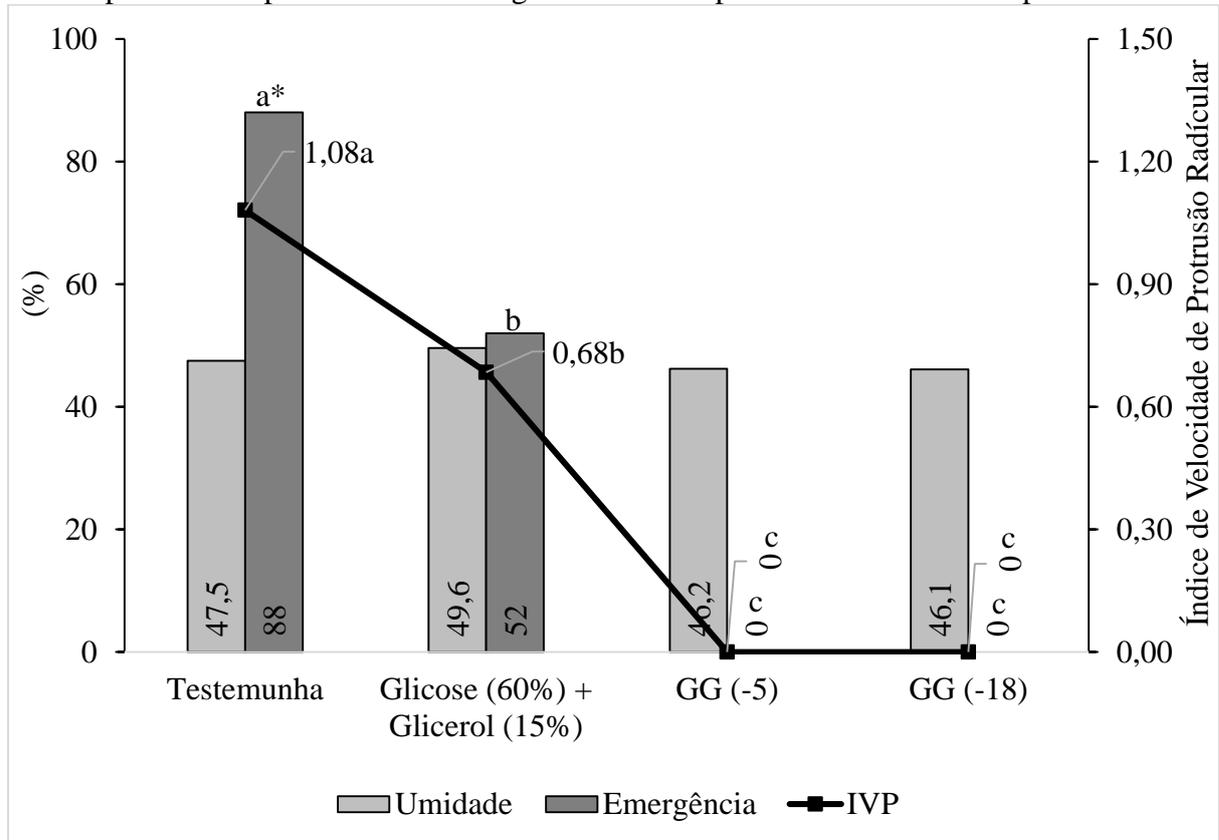
4.7 EXPERIMENTO VII

Em função do insucesso observado nos experimentos anteriores, objetivou-se com o experimento VII avaliar a influência da crioproteção das amêndoas de *A. angustifolia* em solução de glicerol 15% + glicose 60% e do congelamento a temperaturas mais amenas (-5°C e -18°C) sobre a emergência e vigor das sementes de *A. angustifolia*.

Pelo gráfico 8, visualiza-se uma queda de 36 pontos percentuais da emergência após as amêndoas permanecerem em solução de glicerol 15% + glicose 60%, em relação a testemunha. O mesmo ocorreu para vigor onde o IVP caiu de 1,08 para 0,68 em relação a testemunha.

Após serem submetidas a crioproteção com vácuo de -17pol Hg por 2 minutos observava-se um incremento no grau de umidade de 2,1 pontos percentuais. Este resultado possivelmente tenha sido mascarado pela entrada de solutos nas células, aumentando o peso da amostra e interferindo no resultado da umidade da mesma.

GRÁFICO 8 - Umidade, emergência de plântulas e IVP de sementes de *A. angustifolia* imersas em crioprotetores e posteriormente congeladas nas temperaturas de -5 e -18°C por 7 dias.



*As médias de emergência e IVP seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Alguns autores indicam que a qualidade das sementes de *A. angustifolia* pode ser mantida, com percentual de germinação de 97%, se armazenadas sob condições de refrigeração entre 0 e 1°C por um período de até 180 dias (CAÇOLA et al., 2006).

Em outro estudo, foi relatada a manutenção de 61% de germinação de sementes de *A. angustifolia* quando armazenadas por período de até 360 dias em embalagem de polietileno semipermeável em câmara fria (4±1 °C e 89±1% de umidade relativa) (FOWLER et al., 1998).

A velocidade de congelamento é um fator determinante sobre a formação de cristais de gelo, formato e tamanho (MATA et al., 2003). Possivelmente o congelamento lento utilizado neste experimento (-5°C e -18°C) tenha contribuído para que o meio extracelular sofresse congelamento mais rápido, retirando água de dentro da célula. Esse processo causa uma desidratação celular devido a difusão da água presente no interior das células para o meio extracelular, quando a água atinge o meio extracelular congela rapidamente (SANTOS, 2001).

A desidratação induzida por congelamento faz a concentração de solutos do citoplasma celular aumentar e a célula perder turgor até entrar em equilíbrio com o potencial hídrico extracelular (GOLDFARB et al., 2010). Todavia a remoção desta água intracelular não é

controlada e pode matar a célula por desidratação, ou então, em função da quantidade de água transferida para o meio extracelular formar um cristal de gelo desuniforme e grande rompendo as células e causando a sua morte.

Trabalhando com armazenamento de sementes de *A. angustifolia* sob diferentes condições de ambiente Garcia (2012) verificou que após 180 dias a única condição de armazenamento que manteve a viabilidade das sementes foi de 5°C. As sementes armazenadas a temperatura ambiente e em freezer -18°C perderam completamente a viabilidade.

Em experimento com *Inga vera*, espécie recalcitrante, utilizando sementes em diferentes estádios de maturação Bonjovani e Barbedo (2008) relataram que embora nenhum tratamento de secagem testado tenha proporcionado resistência à temperatura de -18 °C, a secagem dos embriões maduros a -4 mega pascal (Mpa) proporcionou maior tolerância à redução de temperatura até níveis de congelamento da água de -2 °C.

4.8 EXPERIMENTO VIII

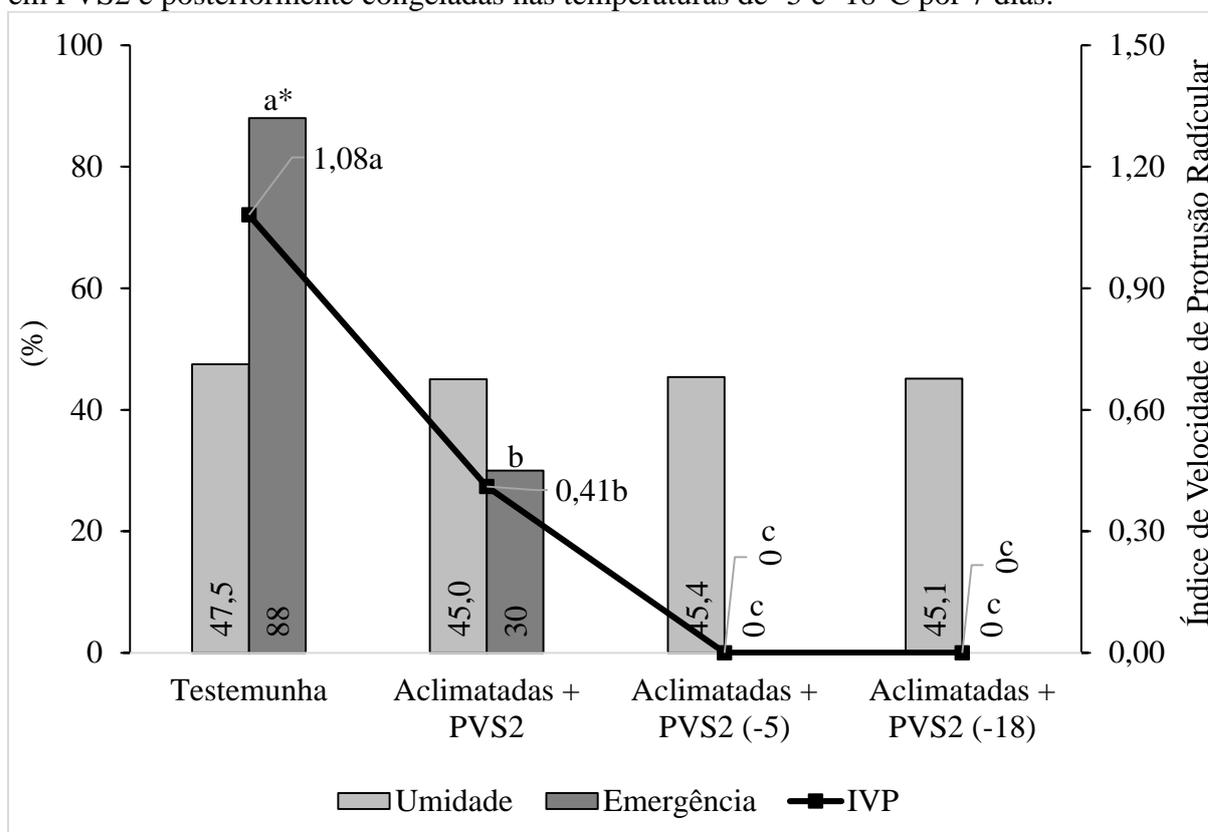
O experimento VIII visou avaliar a eficiência da pré aclimação das amêndoas de *A. angustifolia* antes da imersão em PVS2 e do congelamento a temperatura de -5°C e -18°C.

Pelo gráfico 9 observa-se que a umidade inicial das amêndoas se encontrava em torno de 47,5%, a emergência em 88% e o IVP em 1,08.

Após serem aclimatadas por 15 horas em solução com 0,3M de sacarose e 8 horas em solução com 2M de glicose + 0,4M de sacarose e imersas por 12 horas em PVS2 observou-se pequena redução no grau de umidade das sementes, 2,5 pontos percentuais, e alta queda na emergência e IVP, cujos valores foram 30% e 0,41, respectivamente.

Estes resultados evidenciam o efeito negativo das soluções de pré aclimação e PVS2 sobre as sementes. Entretanto, não se pode descartar um possível efeito prejudicial do vácuo aplicado as sementes (dois minutos a cada troca de solução), o qual tem por finalidade forçar a entrada de solutos nas células e espaços intercelular. Entretanto, quando a pressão exercida é muito grande pode afetar a fisiologia normal da célula.

GRÁFICO 9 - Umidade, emergência de plântulas e IVP de sementes de *A. angustifolia* imersas em PVS2 e posteriormente congeladas nas temperaturas de -5 e -18°C por 7 dias.



*As médias de emergência e IVP seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Ainda pelo gráfico 9 nota-se que ambas temperaturas de congelamento foram letais às amêndoas de araucária, provavelmente em função da desidratação induzida pelo congelamento lento ou em virtude da formação de cristais de gelo e rompimento da parede celular.

Nas sementes recalcitrantes, a condição de alta umidade confere proteção contra a desorganização das membranas, permite a atuação de mecanismos de reparo, a atividade de enzimas importantes, menor ocorrência de danos por embebição e, conseqüentemente, o prolongamento da conservação (MARCOS FILHO, 2005), porém dificulta o armazenamento ou conservação em baixas temperaturas por longos períodos.

A literatura é muito controversa quando se trata de armazenamento e conservação de sementes de *A. angustifolia*. Santos (2014) verificou que a temperatura de 5°C foi a que melhor manteve a qualidade fisiológica das sementes de *A. angustifolia*, sem a realização de assepsia com hipoclorito de sódio, a qual teve efeito fitotóxico sobre as sementes.

Por outro lado, Carrillo et al. (2003) recomendam para a conservação de *A. angustifolia* temperatura de 0°C e embalagens de polietileno e acetato de vinil etil seladas, as quais criam

condições de atmosfera modificada (AM). Tais condições foram apropriadas para o armazenamento, mantendo uma eficaz capacidade germinativa por um período de até dois anos.

5 CONCLUSÕES

Houve redução progressiva da umidade e da viabilidade de sementes de *A. angustifolia* com o aumento do período de imersão em solução de PVS2.

A desidratação das sementes de *A. angustifolia* em sílica gel por 120 horas reduziu a viabilidade, porém o crioprotetor, glicose (60%) + glicerol (15%), quando utilizado por 72 horas, não prejudicou a qualidade fisiológica das sementes.

A criopreservação em nitrogênio líquido e o congelamento em ultrafreezer independentemente do pré-tratamento utilizado foram letais as sementes de *A. angustifolia*.

A desidratação em sílica gel por 48 horas associada de crioproteção com glicose (60%) + glicerol (15%) por 120 horas foi prejudicial a viabilidade e ao vigor das sementes de *A. angustifolia*.

A aclimação das sementes de *A. angustifolia* por 24 horas em solução de 3M de sacarose mais 12 horas em solução com 2M de glicose + 0,4M de sacarose previamente a imersão em PVS2 por 24 horas reduziu a viabilidade e o vigor das sementes.

O congelamento das sementes de *A. angustifolia*, crioprotegidas com glicose (60%) + glicerol (15%), a -5°C e -18°C por 7 dias foi letal.

A aclimação das sementes de *A. angustifolia* por 15 horas em solução de 0,3M de sacarose, mais 8 horas em solução com 2M de glicose + 0,4M de sacarose previamente a imersão de 12 horas em PVS2 reduziu a viabilidade e o vigor das sementes.

O congelamento das sementes de *A. angustifolia*, aclimatadas e crioprotegidas com PVS2, a -5°C e -18°C por 7 dias foi letal.

Com estas sequências de tratamentos utilizados não foi possível estabelecer um protocolo eficiente de criopreservação para sementes de *A. angustifolia*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora não se tenha obtido sucesso com a técnica de criopreservação em sementes de *A. angustifolia* no presente estudo, avanços foram obtidos com os protocolos aqui utilizados. Estes foram evidenciados pelo teste de tetrazólio que mostrou a presença de tecidos metabolicamente ativos mesmo após o congelamento.

As sementes recalcitrantes são sensíveis à dessecação e ao armazenamento em baixas temperaturas. Portanto, para se conseguir sucesso com a técnica de criopreservação há uma série de condições que devem ser satisfeitas.

1 – Reduzir a umidade das sementes até um valor imediatamente acima do considerado crítico para a espécie. Ou seja, não se deve desidratar demasiadamente as sementes afim de não se retirar a água de constituição dos tecidos, mas por outro lado a secagem deve ser realizada visando aumentar a viscosidade intracelular e reduzir a probabilidade de formação de cristais de gelo letal durante o congelamento.

2 – O estado redox do tecido deve ser mantido. Para isto, a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) deve ser reduzida tanto quanto possível (principalmente através da redução do tempo de secagem) e/ou a atividade antioxidante deve ser aumentada, possivelmente pela provisão de antioxidantes exógenos.

3 – Escolher um crioprotetor eficiente visando criar um estado vítreo na célula, porém sem causar fitotoxidez. Para isto, concentração, tempo de imersão e compostos químicos que compõe a solução devem ser testados, visto que a ação de cada um destes fatores varia de espécie para espécie.

Por fim, novos estudos devem ser realizados com a espécie variando os fatores supracitados.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. A. C. et al. Estudo de técnicas para o armazenamento de cinco oleaginosas em condições ambientais e criogênicas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.12, n.2, p.189-202, 2010.
- BASSO, C. M. G. A araucária e a paisagem do planalto sul brasileiro. **Revista de Direito Público**, Londrina, v. 5, n. 2, p. 1-11, 2010.
- BERJAK, P. et al. Possible mechanisms underlying dehydration responses in recalcitrant and orthodox seeds: desiccation-associated subcellular changes in propagules of *Avicennia marina*. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.12, p. 365-384, 1984.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W. Seeds recalcitrance – current perspectives. **South African Journal of Botany**, n. 67, p. 79-89, 2001.
- BONJOVANI, M. R.; BARBEDO, C. J. Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn. toleram temperatura sub-zero. **Revista Brasil. Bot.**, V.31, n.2, p.345-356, abr.-jun. 2008.
- BONJOVANI, M. R. **Taxa respiratória em sementes recalcitrantes de *Inga vera* WILLD. subsp. *affinis*. (DC.) T.D. Pennington**. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica Vegetal). Universidade Estadual Paulista - Instituto de Biociências, Botucatu, 2011.
- BORGES, I.F. et al. Variation in sugars and cyclitols during development and maturation of seeds of brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) **Brazilian Journal of Plant Physiology** 18(4): p. 475-482. 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009, 399 p.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Portaria nº 443, de 17 de dezembro de 2014**: Lista nacional oficial de espécies da flora ameaçadas de extinção. Diário Oficial da União – Seção 1, 2014. Disponível em: <<http://sintse.tse.jus.br/documentos/2014/Dez/18/portaria-no-443-de-17-de-dezembro-de-2014>>. Acesso em 16 Mar. 2016.
- BROWN, A. H. D; HARDNER, C.M. Sampling the gene pools of Forest trees for *ex situ* conservation. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. (Ed.). **Forest conservation genetics: principles and practice**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2000. p. 185-196.
- BUCKERIDGE, M. S. et al. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.38. p.141-156. 2000.
- CAÇOLA, Á. V. et al. Qualidade fisiológica de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze submetidas a diferentes condições de armazenamento e a escarificação. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 4, p. 391-398, 2006.
- CARRILLO, V.P. et al. Refrigerated storage of seeds of *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze over a period of 24 months. **Seed Science and Technology**, Bassersdorf, v. 31, n. 2, p. 411-421, 2003.

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Crioconservação no melhoramento vegetal**. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2003.

CARVALHO, L. R. et al. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, nº 2, p.15-25, 2006.

CARVALHO, P. E. R. **Pinheiro-do-Paraná**. Colombo: EMBRAPA Florestas, 2002.

CASTRO S.V. et al. Intracellular Cryoprotant Agents: Characteristics and Use of Ovarian Tissue and Oocyte Cryopreservation. **Acta Scientiae Veterinariae**. 39(2): 957. 2011.

CHANDEL, K.P.S. et al. **Desiccation and freezing sensitivity in recalcitrant seed of tea, cocoa and jackfruit**. v. 76. New Delhi, India: NBPGR. p.443-450. 1995.

COELHO, R. R. P. **Protocolo de crioconservação de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L. raça *Latifolium* Hutch.) cultivares BRS 200 marrom e BRS verde**. Tese (Doutorado), Universidade Federal da Paraíba, Brasil, 89 p, 2006.

CORLEY, R.A. et al. Development of a physiologically based pharmacokinetic model for ethylene glycol and its metabolite, glycolic acid, in rats and humans. **Toxicological Science**. 85: 476-490. 2005.

CROWE, J.H. et al. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. **Science**, v. 223, p. 701-703, 1984.

DANNER, M. A. et al. O cultivo da araucária para produção de pinhões é uma ferramenta para a conservação. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 32, n. 72, p. 441-451, 2012.

DUMET, D. et al. Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-Letters**, v. 14, p. 243-250, 1993.

EIRA, M. T. S. et al. Efeito do teor de água sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia*(Bert.) O. Ktze. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 16, n. 1, p. 71-75, 1994.

ELLIS, R.H. et al. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental of Botany**, London, v.41, n.230, p.1167-1174, 1990.

FAHY, G.M. et al. Vitrification as na approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v.21; p. 407-426, 1984.

FARJON, A. 2010. *Araucaria angustifolia*. In: IUCN – International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, 2011. **IUCN red list of threatened species**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/32975/0>> Acesso em: 20 de junho de 2015.

FERNANDES, L. D. R; **Aplicação de técnicas de conservação *in vitro* para a conservação de espécies ameaçadas**. Dissertação de mestrado integrado em Engenharia Biológica. Universidade do Algarve. Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais. Faro Portugal. Setembro de 2008.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis sistem. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FLORIANO, E. P. **Armazenamento de sementes florestais**. Caderno didático 1ª ed. Santa Rosa: ANORGS, 2004, 10 p.

FONSECA, S. C. L.; FREIRE, H. B. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 2, p.297-303, 2003.

FOWLER, J. A. P. et al. **Conservação de sementes de pinheiro-do-paraná sob diferentes condições de ambientes e embalagens**. Colombo: EMBRAPA/CNPQ, Comunicado Técnico, n. 34, p.1-4, 1998.

FRIZZO, C. **Comportamento de eixos embrionários de *Araucaria angustifolia* Bertol (O. Kuntze) após a criopreservação, usando o método de encapsulamento-desidratação**. 2013. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

FULLER B; PAYNTER, S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. **Reproductive BioMedicine Online**. 9: 680-869. 2004.

GALDIANO JÚNIOR, R. F. **Criopreservação, indução de poliploidia e avaliação da estabilidade genética de orquídeas**. Tese (Doutorado em genética e melhoramento de plantas). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

GARCIA, C. **Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze sob condições controladas de armazenamento**. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos) Florianópolis: UFSC, 2012.

GARCIA, C. et al. Conservação da viabilidade e vigor de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol) Kuntze durante o armazenamento. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 4, p. 857-867, 2014.

GOLDFARB, M. **Crioconservação e sanidade de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal da Campina Grande, Campina Grande, 2008.

GOLDFARB, M. et al. Cinética de congelamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 7, n. 1, p. 195-203, 2010.

GONZAGA, T. W. C. et al. Crioconservação de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* Engl.), e Baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 5, n. 2, p. 145-154, 2003.

HERINGER, A.S. et al. **Embriogênese somática e criopreservação de embriões somáticos em pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth)**. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos) Florianópolis: UFSC, 2013.

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

KARTHA, K. K. Meristem culture and germplasm preservation. In: Kartha, K. K. (Ed.) **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton, Florida, 1985. pp. 115-134.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. v. 1. 384 p.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 495p. 2005.

MARIN, M. L.; DURAN, N. Survival of somatic embryos and recovery of plants of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) after immersion in liquid nitrogen. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.14, p.51-57, 1988.

MARTINS, L. et al. Conservação de sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl.) em nitrogênio líquido. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 31, nº 2, p.071-076, 2009.

MATA, M. E. R. M. et al. Curvas de congelamento de frutos de cajá (*Spondias lutea* L.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, Especial, n. 1, p. 55-62, 2003.

MATTOS, J. R. **O pinheiro brasileiro**. Florianópolis: Ed. da UFSC, 2011. 700p.

MEDEIROS, A. C. S.; EIRA, M. T. S. **Comportamento fisiológico, secagem e armazenamento de sementes florestais nativas**. Colombo: EMBRAPA Florestas, Circular técnica, n. 127, 2006.

MEDEIROS, A.C.S.; CAVALLARI, D.A.N. Conservação de germoplasma de aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engl. I. Germinação de sementes após imersão em nitrogênio líquido (-196°C). **Revista Brasileira de Sementes**, DF, v.14, n.1, p.73-75, 1992.

MENDONÇA, R.M.N.; DIAS, D.C.F. Conservação de sementes de fruteiras tropicais recalcitrantes: uma abordagem. Revisão bibliográfica. **Agropecuária Técnica**, v.21, n.1/2, p.57-73 2000.

MOLINA, T. F. et al. Crioconservação em sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 28, nº 3, p.72-81, 2006.

MORALES, E. A. V.; VALOIS, A. C. C. Princípios genéticos para recursos genéticos. **Dialogo XLV – Conservacion de germoplasma vegetal**. Montevideo, Uruguay: IICA, p.35-48. 1996.

NASS, L. L. et al. **Recursos genéticos e melhoramento: plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 1183 p. 2001.

- NOGUEIRA, G. F. **Criopreservação e produção de sementes sintéticas *in vitro* de mangabeira**. Dissertação (mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG. 72 p. 2010.
- OLIVEIRA, L. M. et al. Metodologia alternativa para o teste de tetrazólio em sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. **Floresta e Ambiente**, v. 21, n. 4, p. 468-474, 2014.
- OBENDORF, R.L. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. **Seed Science Research** v.7. p.63-74. 1997.
- PEREIRA NETO, L. G. **Germinação de sementes de soja armazenadas em bancos de germoplasma**, 76p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras MG, 2004.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1977. 289p.
- PORTO, J. M. P. **Criopreservação de calos, ápices caulinares e sementes de barbatimão**. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- REGO, S. S. **Tolerância à desidratação e armazenamento de sementes de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) Berg. E *Casearia decandra* Jacq.** 142f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2012.
- ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, 1: 499-514, 1973.
- RODRIGUES, A. P. R. et al. Criopreservação de oócitos mamíferos: importância, estado atual, limitações e perspectivas. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 11, n. 2, p. 101-112, 2001.
- ROOS, E.E.; STANWOOD, P.C. Effects of low temperature, cooling rate and moisture content on seed germination of lettuce. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, n.106, p.30-34, 1981.
- Royal Botanic Gardens Kew. **Seed Information Database (SID)**. Version 7.1. 2008.
- SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS-based vitification and encapsulation-vitrification protocols. In: Reed, B. **Plant Cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer. p. 33-58, 2008.
- SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal: A alternativa para conservação a longo prazo. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 20, p 60 - 65, 2001.
- SANTOS, I. R. I. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 12 ed. (Edição Especial), p. 70-84, 2000.
- SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, I. N. **Manual de curadores de germoplasma – vegetal: Criopreservação**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010.

SANTOS, J. C. S. **Conservação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze submetidas a diferentes condições de armazenamento.** Laranjeiras do Sul: UFFS, 2014.

SILVA, B. A. **Tecnologia de sementes de araucária: avaliação do teor de água e da viabilidade pelo teste de tetrazólio.** Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

SIMIONI, F.P. Key issues relating to the genetic stability and preservation of cells and cell banks. J. Parent. **Science and Technology**, v.46, p.226-232, 1992.

SOARES, T. S. Araucária – o Pinheiro Brasileiro. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal.** ISSN 1678-3867, Ano II. n°3. Fev, 2004.

SOLÓRZANO-FILHO, J. A.; KRAUS, J. E. Breve história das matas de Araucária. **Revista Florest**, Rio de Janeiro, p. 37-40, 1999.

SOUZA, G. A. **Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de seringueira *Hevea brasiliensis* (Willd. Ex. ADR. de Juss.) Müell. Arg.] durante o desenvolvimento e o armazenamento.** Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 3 ed. Artmed: Porto Alegre, 2013.

TOMBOLATO, A. F. C. et al. Crioconservação de sementes de Amaryllidaceae. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 5, n. 1, p. 77 - 82, 2009.

TOMPSETT, P. B. Desiccation studies in relation to the storage of Araucaria seed. **Annals of Applied Botany**, v. 105, n. 3, p.581-586, 1984.

VEIGA, R. F. et al. A crioconservação de sementes de recursos genéticos hortícolas no Instituto Agrônomo (IAC). **O agrônomo**, Campinas, v.58, n.1/2, p. 19-21, jan. 2006.

VIEIRA, M.G.G.C; VON PINHO, É.V.R. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de algodão. In: KRZYŻANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. Vigor de sementes: Conceitos e testes. Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, Comitê de Vigor de Sementes. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

WALTERS C.; et al. Longevity of cryogenically stored seeds. **Cryobiology**, v.48, p.229-244, 2004.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. **Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas.** In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, DF: Embrapa- SPI: Embrapa-CNPq, p. 297-330. 1998.

WUSTEMAN M. et al. Reduction of cryoprotectant toxicity in cell in suspension by use of a sodium-free vehicle solution. **Cryobiology**. 56: 2008.