



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL  
CAMPUS DE LARANJEIRAS DO SUL  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**ANDRE DA SILVA LEFCHAK**

**INFLUÊNCIA DE CRIOPROTETORES E DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A  
QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE *Araucaria angustifolia* E *Eugenia  
uniiflora***

**LARANJEIRAS DO SUL**

**2016**

**ANDRE DA SILVA LEFCHAK**

**INFLUÊNCIA DE CRIOPROTETORES E DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A  
QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE *Araucaria angustifolia* E *Eugenia  
uniflora***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Agronomia – Linha de formação em Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito para obtenção de Título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Prof. Dr. Lisandro Tomas da Silva Bonome.

**LARANJEIRAS DO SUL**

**2016**

### DGI/DGCI - Divisão de Gestão de Conhecimento e Inovação

Lefchak, Andre da Silva

INFLUÊNCIA DE CRIOPROTETORES E DA CRIOPRESERVAÇÃO  
SOBRE A QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE Araucaria  
angustifolia E Eugenia uniflora / Andre da Silva  
Lefchak. -- 2016.

60 f.:il.

Orientador: Lisandro Tomas da Silva Bonome.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de  
Agronomia , Laranjeiras do Sul, PR, 2016.

1. Pinheiro-do-Paraná. 2. Pinhão. 3. Pitanga. 4.  
Vigor. I. Bonome, Lisandro Tomas da Silva, orient. II.  
Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**ANDRE DA SILVA LEFCHAK**

**INFLUÊNCIA DE CRIOPROTETORES E DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A  
QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE *Araucaria angustifolia* E  
*Eugenia uniflora***

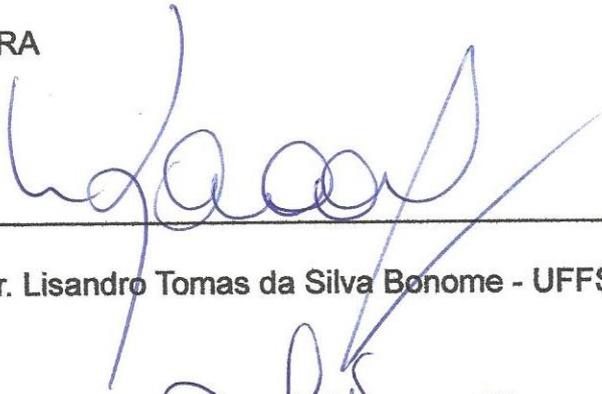
Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Agronomia com Ênfase em Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul - Campus Laranjeiras do Sul (PR).

Orientador: Prof. Dr. Lisandro Tomas da Silva Bonome

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:

08 / 07 / 2016

**BANCA EXAMINADORA**



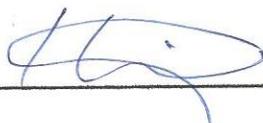
---

Prof. Dr. Lisandro Tomas da Silva Bonome - UFFS



---

Eng. Agrônomo Marcio Renato Dulnik



---

Prof. MSc. Henrique Von Hertwig Bittencourt - UFFS

Dedico este trabalho a meus pais Marli e Valmir e a minha namorada Marizete.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela vida e por todas as vitórias e derrotas que permitiram que eu me tornasse o sujeito que sou hoje.

Agradeço a Deus pela família abençoada que tenho e por todas as pessoas maravilhosas que conheci na graduação. A meus pais sou grato por seu esforço para me dar todo o subsídio educacional, financeiro e emocional, necessário para que eu chegasse a conclusão da graduação.

Agradeço ao professor Lisandro por sua amizade, companheirismo e por ter me orientado desde o primeiro momento até a conclusão deste trabalho, por todas as suas contribuições e por ser um excelente professor na graduação. Agradeço por sua orientação em trabalhos realizados junto com a equipe do Laboratório de Fisiologia Vegetal e por tudo que me ensinou.

Ao professor Henrique agradeço pela amizade e companheirismo. Sou grato pelas orientações em projetos e também pelos conselhos relacionados a graduação e vida profissional.

Como professores me ensinaram a profissão, mas como pessoas me cativaram e ensinaram a cultivar simplicidade, humildade, ética e conhecimento.

Agradeço a equipe do Laboratório de Fisiologia vegetal e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos que compartilharam comigo tanto a graduação como a realização deste trabalho, agradeço pelo companheirismo durante esses anos, em especial aos meus colegas, Marcelo, Edenilson, Leandro, Elder, Jucelio e Jakeline.

Certa vez um professor disse que sozinhos chegamos a um resultado muito aquém do que poderíamos chegar cooperando e com a cooperação de outras pessoas. Se foi possível chegar a etapa conclusiva desse trabalho e da graduação, não foi devido apenas a um esforço individual. Muita gente, de alguma forma, ou de outra, contribuiu para chegar a esse resultado. A vocês agradeço não apenas com palavras, mas do fundo do coração.

Muito obrigado!

## LISTA DE IMAGENS

<b>Imagem 1.</b> Semente de <i>Araucaria angustifolia</i> .....	16
<b>Imagem 2.</b> Esquema metodológico utilizado no bioensaio 1. ....	24
<b>Imagem 3.</b> Esquema metodológico adotado no bioensaio 2.....	27
<b>Imagem 4.</b> Esquema metodológico adotado no bioensaio 3.....	29
<b>Imagem 5.</b> Esquema metodológico adotado no bioensaio 4.....	32
<b>Imagem 6.</b> Montagem do teste de germinação em papel germitest com estria das sementes de pitanga voltada a face inferior do papel.....	35
<b>Imagem 7.</b> Corte de sementes de pitanga para realização do teste de tetrazólio. ....	36
<b>Imagem 8.</b> Classes de viabilidade de Pitanga ( <i>Eugenia uniflora</i> L.) encontrados em teste de tetrazólio. ....	36
<b>Imagem 9.</b> Embriões de sementes de araucária imersos em solução de PVS2 por diferentes períodos de tempo e coloridos com sal de tetrazólio.....	41
<b>Imagem 10.</b> Teste de tetrazólio realizado em embriões de sementes de araucária dessecadas 120 horas em sílica gel, imersas 144 horas em glicose (60%) + glicerol (15%) e criopreservadas em nitrogênio líquido. ....	44
<b>Imagem 11.</b> Danos causados por <i>Cydia araucariaceae</i> em semente e embrião de <i>Araucaria angustifolia</i> . ....	45
<b>Imagem 12.</b> Resultados do teste de tetrazólio realizado em sementes de pitanga submetidas a diferentes tratamentos.....	52
<b>Imagem 13.</b> Resultado do teste de tetrazólio realizado no tratamento com secagem e sem congelamento.....	54

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Porcentagem média de emergência de plântulas de araucária obtidas a partir de sementes tratadas com diferentes crioprotetores e concentrações. ....	38
<b>Gráfico 2.</b> Índice de velocidade de emergência de plântulas de araucária obtidas a partir de sementes tratadas com diferentes crioprotetores e concentrações. ....	39
<b>Gráfico 3.</b> Viabilidade de embriões de <i>Araucaria angustifolia</i> , estimada pelo teste de tetrazólio, em função da porcentagem de umidade das amêndoas das sementes obtidos por diferentes períodos de imersão em solução PVS2. ....	40
<b>Gráfico 4.</b> Viabilidade de embriões de <i>Araucaria angustifolia</i> , submetidos ao teste de tetrazólio, em função de níveis de umidade das amêndoas das sementes obtidos por diferentes métodos e períodos de dessecação. ....	43
<b>Gráfico 5.</b> Umidade das sementes de pitanga. ....	46
<b>Gráfico 6.</b> Porcentagem média de protrusão radicular de sementes de pitanga criopreservadas 33 dias após a sementeira. ....	47
<b>Gráfico 7.</b> Porcentagem média de plântulas normais de sementes de pitanga criopreservadas 33 dias após a sementeira. ....	48
<b>Gráfico 8.</b> Condutividade elétrica média de sementes de pitanga com e sem secagem submetidas a diferentes tratamentos de criopreservação. ....	49
<b>Gráfico 9.</b> Porcentagem média de sementes de pitanga não viáveis verificadas no teste de tetrazólio. ....	51
<b>Gráfico 10.</b> Resposta ao teste de tetrazólio das sementes de pitanga submetidas ao tratamento com secagem e sem congelamento. ....	53

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>10</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
1.1 OBJETIVOS .....	12
<b>1.1.1 Objetivo geral .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>12</b>
1.2 JUSTIFICATIVA .....	12
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>13</b>
2.1 SEMENTES RECALCITRANTES.....	13
2.2 A ARAUCÁRIA E A PITANGUEIRA.....	14
2.2 A CRIOPRESERVAÇÃO .....	17
<b>2.2.1 Importância do grau de umidade na criopreservação.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2.2 Crioproteção .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2.3 Resfriamento.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2.4 Congelamento lento.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2.5 Congelamento rápido.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.6 Armazenamento .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2.7 Descongelamento .....</b>	<b>22</b>
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>23</b>
3.1 ORIGEM E OBTENÇÃO DAS SEMENTES.....	23
3.2 EFEITO DE DIFERENTES CRIOPROTETORES NA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA .....	24
<b>3.2.2 Determinação do grau de umidade das sementes de araucária .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.3 Teste de emergência e índice de velocidade de emergência de plântulas.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.4 Delineamento experimental e análise estatística .....</b>	<b>25</b>
3.3 EFEITO DE DIFERENTES PERÍODOS DE IMERSÃO EM PVS2 SOBRE O GRAU DE UMIDADE E A QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA .....	27
<b>3.3.1 Determinação de umidade das sementes de araucária .....</b>	<b>27</b>
<b>3.3.2 Teste de tetrazólio.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3.3 Delineamento experimental e análise estatística .....</b>	<b>28</b>
3.4 EFEITO DA SILICA GEL, PERÍODOS DE IMERSÃO EM GLICOSE (60%) + GLICEROL (15%) E CONGELAMENTO EM NITROGÊNIO SOBRE QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA .....	29

3.4.1	Determinação de umidade das sementes de araucária .....	30
3.4.2	Teste de tetrazólio.....	30
3.4.3	Teste de emergência de plântulas .....	30
3.4.4	Delineamento experimental e análise estatística .....	31
3.5	EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO EM SEMENTES DE PITANGA .....	31
3.5.1	Pré-vitrificação das sementes de pitanga .....	33
3.5.2	Secagem das sementes .....	33
3.5.3	Congelamento .....	33
3.5.4	Descongelamento .....	33
3.5.5	Lavagem das sementes .....	33
3.5.6	Determinação de umidade das sementes de pitanga .....	34
3.5.7	Protrusão radicular e germinação de sementes de pitanga.....	34
3.5.8	Teste de condutividade elétrica .....	35
3.5.9	Teste de tetrazólio com sementes de pitanga .....	35
3.5.10	Delineamento experimental e análise estatística .....	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
4.1	EFEITO DE DIFERENTES CRIOPROTETORES NA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA .....	38
4.2	EFEITO DE DIFERENTES PERÍODOS DE IMERSÃO EM PVS2 SOBRE O GRAU DE UMIDADE E A QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA .....	40
4.3	EFEITO DA SILICA GEL, PERÍODOS DE IMERSÃO EM GLICOSE (60%) + GLICEROL (15%) E CONGELAMENTO EM NITROGÊNIO SOBRE QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA .....	43
4.4	EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO EM SEMENTES DE PITANGA .....	46
5	CONCLUSÕES.....	55
	REFERÊNCIAS .....	56

## RESUMO

As sementes recalcitrantes apresentam baixa longevidade em ambiente natural e são de difícil conservação. Esse grupo de sementes não tolera umidades e temperaturas baixas, que são os principais fatores utilizados pelos métodos convencionais de conservação de sementes, portanto, não são adequados para sementes recalcitrantes. Uma alternativa promissora para a conservação das sementes recalcitrantes é a criopreservação. Diante do exposto, esse trabalho teve por objetivo avaliar a influência de crioprotetores e da criopreservação sobre a qualidade fisiológica de sementes de *Araucaria angustifolia* e *Eugenia uniflora*. O trabalho foi dividido em quatro bioensaios: os três primeiros com sementes de *A. angustifolia* e o quarto com sementes de *E. uniflora*. O bioensaio 1 conteve 9 tratamentos: glicerol a 10%, 20%, 30% e 40%; sacarose a 0,5; 1 e 1,5 mol.L<sup>-1</sup> e dextrose 2 mol.L<sup>-1</sup> em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Foram determinadas a umidade, emergência e índice de velocidade de emergência. O bioensaio 2 conteve 5 tratamentos: imersão em solução PVS2 por 0, 12, 24, 36 e 48 horas. O bioensaio 3 conteve 5 tratamentos: dessecação em sílica gel 120 horas, imersão em solução de glicose (60%) + glicerol (15%) por 72 e 144 horas e criopreservação. Os bioensaios 2 e 3 foram conduzidos em DIC e foram realizados os testes de umidade e tetrazólio. No bioensaio 4 foi realizada a crioproteção das sementes com imersão por uma hora em solução de glicerol + sacarose seguida de imersão por 6 horas em solução PVS2. O experimento foi conduzido em DIC com 7 tratamentos: testemunha; sem secagem e sem congelamento; sem secagem e com congelamento em ultrafreezer; sem secagem e com congelamento em nitrogênio líquido; com secagem e sem congelamento; com secagem e com congelamento em ultrafreezer; com secagem e com congelamento em nitrogênio líquido. Foram realizados os testes de umidade, protrusão radicular, germinação, condutividade elétrica e tetrazólio. Os resultados foram submetidos a análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de significância. Concluiu-se que: Os efeitos dos crioprotetores sobre a qualidade fisiológica das sementes, variaram em função da espécie, tipo de crioprotetor, concentração utilizada e tempo em contato com a semente. A criopreservação foi prejudicial para as sementes de *A. angustifolia* e de *E. uniflora*, causando perda da viabilidade. Os crioprotetores do bioensaio 1 não causaram prejuízos sobre a qualidade fisiológica de sementes de *A. angustifolia*. A solução PVS2 reduziu o grau de umidade de sementes de *A. angustifolia* e também a viabilidade. O uso de sílica gel por 120 horas e glicose (60%) + glicerol (15%) por 72 e 144 permitiu a redução da umidade de sementes de *A. angustifolia*, porém, a viabilidade das sementes reduziu conforme a umidade. O pré tratamento de sementes de *E. uniflora* com glicerol + sacarose e PVS2 não reduziu a umidade e não causou prejuízos sobre a germinação, no entanto, houve redução no vigor das sementes medido pelo teste de condutividade elétrica. A criopreservação por congelamento rápido não foi eficiente para manutenção da qualidade fisiológica de sementes de *A. angustifolia* e *E. uniflora*, causando alta mortalidade nas sementes das duas espécies. A criopreservação por congelamento lento não foi eficiente para manutenção da qualidade fisiológica de sementes de *E. uniflora*, causando alta perda de viabilidade das sementes.

## 1 INTRODUÇÃO

Na maioria das espécies vegetais de importância econômica, a qualidade fisiológica das sementes pode ser conservada pela redução do seu teor de água e da temperatura do ambiente, sendo denominadas ortodoxas. Por outro lado, cerca de 7 % das espécies de interesse econômico possuem sementes que, além de serem sensíveis à dessecação, não toleram o armazenamento sob baixas temperaturas, dificultando sua conservação por períodos prolongados, sendo denominadas de recalcitrantes (FONSECA; FREIRE, 2003). Ainda há um terceiro grupo de espécies denominadas intermediárias, em que suas sementes podem ser dessecadas a níveis relativamente baixos porém sofrem danos a temperaturas abaixo de zero graus (SANTOS, 2000). Dentre as espécies de interesse econômico que apresentam sementes recalcitrantes destacam-se: seringueira, cacaueteiro, araucária, pitangueira, abacateiro, mangueira, jaqueira e citros (HONG; ELLIS, 1996; DELGADO; BARBEDO, 2007).

A característica recalcitrante das sementes faz com que elas percam, rapidamente, o poder germinativo, principalmente quando o seu teor de água é reduzido a valores inferiores a 30% (CÍCERO, 1986). Esse fato dificulta severamente o armazenamento das sementes prejudicando a instalação de viveiros, a produção e a disponibilização de mudas de espécies com sementes recalcitrantes, gerando restrição de oferta de mudas em determinadas épocas do ano, ou tornando-as disponíveis em épocas inadequadas ao plantio. Além disso, a característica recalcitrante das sementes constitui-se em um entrave para a conservação *ex situ*, a qual é realizada fora da área de ocorrência da espécie, em bancos de germoplasma. Esta é uma importante alternativa para a conservação dos recursos genéticos das espécies (BROWN; HARDNER, 2000).

A incapacidade de conservação das sementes recalcitrantes pelos métodos tradicionais utilizados para sementes ortodoxas tem dirigido esforços de pesquisadores na busca por métodos alternativos de conservação. Dentre eles merece destaque a criopreservação, cujo método consiste em armazenagem de material vegetal em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , ou na sua fase de vapor a  $-150^{\circ}\text{C}$ . Quando o material atinge a temperatura de  $-140^{\circ}\text{C}$  a atividade metabólica chega a níveis insignificantes. Geralmente permitindo a conservação do material vegetal por longos períodos e posteriormente recuperá-lo sem lesões letais (FRIZZO, 2013). Portanto este trabalho teve por objetivo avaliar a influência de crioprotetores e da criopreservação sobre a qualidade fisiológica de sementes de *Araucaria angustifolia* e *Eugenia uniflora*.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a influência de crioprotetores e da criopreservação sobre a qualidade fisiológica de sementes de *Araucaria angustifolia* e *Eugenia uniflora*.

### 1.1.2 Objetivos específicos

a) Avaliar o efeito de diferentes crioprotetores e concentrações sobre a qualidade fisiológica de sementes de *Araucaria angustifolia*.

b) Avaliar a influência de diferentes crioprotetores no grau de umidade das sementes de *Araucaria angustifolia* e *Eugenia uniflora*.

c) Verificar se a criopreservação por congelamento rápido é eficiente para manutenção da qualidade fisiológica de sementes de *Araucaria angustifolia* e *Eugenia uniflora*.

d) Verificar se a criopreservação por congelamento lento é eficiente para manutenção da qualidade fisiológica de sementes de *Eugenia uniflora*.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

Dentre as espécies de interesse econômico cerca de 7% apresentam sementes recalcitrantes de difícil conservação, pois não toleram a dessecação e baixas temperaturas.

Diante disso, surge a necessidade de se pesquisar formas alternativas de conservação de sementes recalcitrantes, como de *Araucaria angustifolia* e *Eugenia uniflora*. Uma técnica promissora é a criopreservação, que consiste na armazenagem de material vegetal em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , ou na sua fase de vapor a  $-150^{\circ}\text{C}$  por longos períodos de tempo (SANTOS, 2000).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 SEMENTES RECALCITRANTES

As sementes podem ser separadas em ortodoxas ou recalcitrantes de acordo com a classificação de Roberts (1973). As sementes ortodoxas podem ser dessecadas a baixíssimos teores de umidade (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 “teor letal de umidade”. Um terceiro grupo de sementes com comportamento intermediário ao das ortodoxas e recalcitrantes foi proposto após a classificação de Roberts. 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 (BONOME et al., 2006).

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 maturidade fisiológica a semente entra em maturação e sofre dessecação. A dessecação reduz gradativamente o metabolismo da semente fazendo com que o embrião se torne quiescente. No entanto nas sementes recalcitrantes não ocorre a terceira fase, pois 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 recalcitrantes também podem ser classificadas quanto ao nível de recalcitrância. Nessa classificação tais sementes podem apresentar comportamento minimamente, moderadamente e altamente recalcitrante. As minimamente recalcitrantes são as que apresentam maior tolerância a dessecação e a baixas temperaturas. As moderadamente recalcitrantes são sensíveis a baixas temperaturas, toleram desidratações moderadas. Todavia as altamente recalcitrantes são pouco tolerantes a dessecação e são sensíveis a baixas temperaturas (SILVA, 2007).

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.

Bonome et al. (2006) discorre que o armazenamento de sementes constitui num conjunto de técnicas e procedimentos realizados com o intuito de manter a qualidade inicial das sementes. Estas técnicas visam minimizar a deterioração fisiológica através do controle de fatores ambientais, proporcionando-se um ambiente ideal para a conservação das sementes.

A conservação de sementes via armazenamento é realizada visando a sua posterior semeadura, esperando-se obter plântulas normais. 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 de acordo com Souza (2014) 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) ainda 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 recalcitrantes 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.

## 2.2 A ARAUCÁRIA E A PITANGUEIRA

Dentre as espécies de interesse econômico que apresentam sementes com comportamento recalcitrante e, portanto, com dificuldade de armazenamento destacam-se o Pinheiro-do-Paraná (*Araucaria angustifolia*) e a pitangueira (*Eugenia uniflora*).

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: *Araucaria angustifolia* e *Araucaria araucana*. A primeira é a que tem maior expressão em área (BASSO, 2010).

A *A. angustifolia* é conhecida popularmente como Pinheiro-do-Paraná, pinheiro brasileiro e araucária, e ocorre naturalmente no Brasil, desde a latitude 19° 15' S à 31 ° 30' S (CARVALHO, 2002). *Araucaria angustifolia* é uma espécie florestal característica da Floresta Ombrófila Mista que faz parte do domínio Mata Atlântica (Brasil, 2012). Essa formação vegetal distribui-se principalmente pela Região Sul brasileira, mas pode ocorrer em algumas áreas dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, além da região da Província das Misiones na Argentina. A presença da araucária imprime uma fisionomia marcante nessa formação vegetal, devido ao tronco reto e copa característica da espécie (em forma de parábola) que se sobressai sobre a altura média da floresta, podendo chegar a 50 metros de altura, por este motivo a presença da araucária é usada como principal fator para delimitar essa formação vegetal (CARVALHO, 2006a). Danner et al. (2012) afirma que o estrato superior da Floresta Ombrófila Mista é dominado por *A. angustifolia*, que compõe cerca de 40% dos indivíduos.

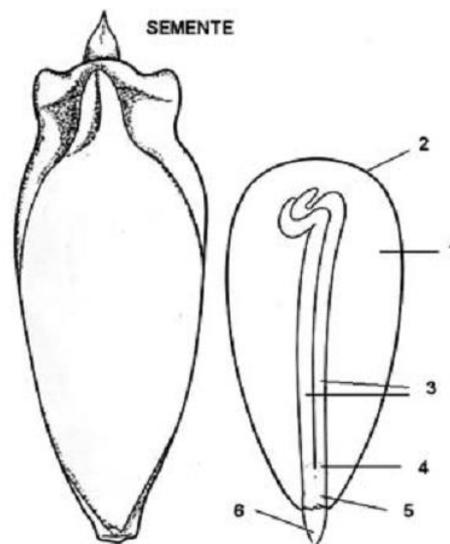
É inegável a importância da araucária como alimento, pois suas sementes, os pinhões, tem elevado teor nutritivo, em função de suas reservas de amido e quantidades significativas de proteínas e lipídios (DANNER et al., 2012). A espécie também apresenta importância econômica, pois somente no ano de 2011 foram comercializadas em mercados atacadistas, como a CEAGESP de São Paulo e CEASAs dos Estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná, um total de 3.399 toneladas de pinhão, movimentando cerca de 6,23 milhões de reais apenas nestes centros de comercialização. No entanto o autor ainda discute que muitas famílias de baixa renda realizam a coleta e venda informal de pinhão em beira de estradas, como uma das suas fontes de renda. Esse fato evidencia que os dados de comercialização de pinhão são subestimados e que além da importância alimentícia e econômica a araucária possui importância social.

Seu potencial como recurso alimentício se associa a sua importância ecológica, pois o pinhão serve como fonte de alimento para uma ampla diversidade da fauna associada a Floresta Ombrófila Mista. Exemplos são: a gralha azul; 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, sendo que estes animais atuam na dispersão das sementes (BASSO, 2010).

A espécie possui elevado valor econômico como recurso madeireiro, no entanto está ameaçada de extinção principalmente devido a exploração excessiva de sua madeira (OLIVEIRA et al., 2014) e por este motivo a *A. angustifolia* está entre as espécies que compõem a Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2014).

As sementes de araucária, chamadas de pinhão, formam-se nas pinhas, que são pseudofrutos com tamanho variando de 10 a 25 cm de diâmetro e compostos de 700 a 1200 escamas. As sementes formam-se a partir de óvulos nus, apresentando tegumento duro e endosperma abundante, o qual possui cerca de 55% de amido e alto teor de aminoácidos. Um pinhão geralmente apresenta comprimento variando entre 3 e 8 cm, largura entre 1 a 2,5 cm e peso médio de 8,7 g (Imagem 1). O formato da semente é obovalada-oblonga possuindo uma extremidade terminando em ápice com espinho curvado na ponta (Imagem 1). O embrião encontra-se no interior do endosperma, onde os cotilédones ocupam 5/6 do tamanho do embrião (CARVALHO, 2002).

**Imagem 1.** Semente de *Araucaria angustifolia*.



1-Endosperma; 2-Tegumento; 3-Cotilédones; 4-Meristema apical; 5-Hipocotilo; 6-Radicula.

**Fonte:** BRASIL (2009).

As sementes de araucária de acordo com Garcia et al. (2014) são a principal forma de propagação da espécie. No entanto isso torna-se um problema devido a sua classificação como semente recalcitrante (TOMPSETT, 1984; EIRA, 1994; MEDEIROS; EIRA, 2006), pois faz com que a semente tenha baixa durabilidade no ambiente.

Eira (1994) determinou que o teor crítico de água para sementes de *A. angustifolia* é de 38% com tegumento e 39% quando o tegumento era removido, ocorrendo perda total da viabilidade das sementes quando o teor de água era inferior a estes valores. Portanto a recalcitrância é uma característica que agrava a situação da espécie que além de ameaçada de extinção tem material propagativo com baixa longevidade, resultando em uma baixa capacidade de propagação para a araucária. Por isso, o armazenamento de sementes pode ser uma opção para conservar as sementes de araucária, amenizando o problema da baixa longevidade das sementes.

A pitangueira (*E. uniflora*) é uma espécie frutífera com ocorrência natural no Brasil e também na Argentina e Uruguai, pertencente a Família Mirtaceae (AVILA et al., 2009). No Brasil a espécie é nativa e amplamente encontrada nas Regiões Sul e Sudeste, porém está presente em praticamente todo o território nacional (VENDRAMIN; CARVALHO, 2013).

A pitangueira possui potencial econômico devido as características de seus frutos e madeira de qualidade (AVILA et al., 2009). Além de possuir importância ecológica por seus frutos também serem apreciados por animais silvestres.

Além dos frutos de pitangueira serem consumidos in natura, também são utilizados como polpa congelada, no preparo de sucos, fabricação de sorvetes, refrescos, geleias, licores e vinhos (BEZERRA et al., 2002) reafirmando a sua importância econômica e também culinária.

A pitangueira é uma planta que possui propriedades medicinais, pois apresenta substâncias com potencial farmacológico de efeito diurético, anti-inflamatório, anti-hipertensivo e hiperglicêmico (DELGADO e BARBEDO, 2007). Além disso, de acordo com Moritz; Tramonte (2006), a pitanga possui um teor significativo de carotenóides os quais o homem é incapaz de sintetizar e que combatem radicais livres. Um deles é o Licopeno que contribui para a redução do risco de câncer, doenças cardiovasculares e outras.

Os pomares cultivados com pitanga em sua maioria são provenientes de plantas propagadas via sementes (BEZERRA et al., 2002). As sementes de *E. uniflora* são recalcitrantes, perdendo sua viabilidade quando a umidade é reduzida a valores inferiores a 32,5% (DELGADO, 2006; WIELEWICKI et al., 2006).

## 2.2 A CRIOPRESERVAÇÃO

Em função da característica de recalcitrância das sementes de *Araucária angustifolia* e *Eugenia uniflora*, torna-se necessário a busca por métodos alternativos de conservação destas espécies. Um método promissor é a criopreservação que consiste em conservar o material

vegetal a temperaturas ultrabaixas, uma das opções é o uso do nitrogênio, tanto em sua fase de vapor (-150°C) quanto em sua fase líquida (-196°C). Desse modo, o material criopreservado chega a inativar a respiração e processos enzimáticos, evitando que ocorra deterioração fisiológica significativa em função do período armazenado (TOMBLATO et al., 2009). Assim, é possível promover a conservação do material por longos períodos de tempo mantendo a sua qualidade fisiológica (PORTO, 2013). A criopreservação tem vantagem sobre os demais métodos de conservação de material vegetal porque abre a possibilidade de conservação por tempo muito superior aos outros métodos (GOLDFARB et al., 2008).

O método da 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 (GONZAGA et al., 2003).

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.

### **2.2.1 Importância do grau de umidade na criopreservação**

Um grande obstáculo a ser vencido no processo de criopreservação, principalmente durante o resfriamento e descongelamento do material vegetal, é a formação de cristais de gelo. Esses cristais se formam a partir da água intracelular nos 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).

O grau de umidade é um dos fatores mais críticos para o processo de criopreservação de sementes, por este motivo deve-se reduzi-lo a fim de se evitar injúrias com a formação de gelo, porém a água exerce muitas funções biológicas nas células e sua retirada também pode ser danosa (PORTO, 2013). Tem-se utilizado de substâncias crioprotetoras para reduzir o teor de água e proteger as células na criopreservação. Em especial nas sementes recalcitrantes a diminuição da umidade e a forma com que se realiza essa redução é um desafio a ser vencido.

Carvalho e Vidal (2003) dividem a criopreservação em cinco etapas, são elas: pré-crescimento, crioproteção, resfriamento, armazenamento, descongelamento e regeneração. No entanto, a primeira e a última etapa se referem a criopreservação de culturas de tecido celulares e, portanto, não serão abordadas aqui.

### 2.2.2 Crioproteção

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).

A crioproteção é feita expondo o material vegetal a soluções contendo crioprotetores, que têm função de diminuir o ponto de congelamento e a formação de cristais de gelo intracelular no material criopreservado (SANTOS e SALOMÃO, 2010).

Os crioprotetores são capazes de proteger o material biológico das injúrias causadas pela desidratação (CARVALHO, 2006b). Exemplos de substâncias crioprotetoras são: dimetilsulfóxidos (DMSO), etileno glicol, 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.

A ação dos açúcares como crioprotetores ainda não é totalmente conhecida, existem duas hipóteses que tentam explicá-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 ter sido removida. Esta última 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 celular de modo a atuar em substituição a água (CROWE; CROWE; CHAPMAN, 1984).

A crioproteção também tem sido realizada com soluções compostas de mistura de crioprotetores. Heringer (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.

Segundo Frizzo (2013), a composição das soluções PVS 1, 2 e 3 é: PVS1, composta de glicerol (22% v/v), etileno glicol (15% v/v), propileno glicol (15% v/v), dimetilsulfóxido (DMSO) (7% v/v) e sorbitol (9,1% v/v). A PVS2 é composta por 0,4 M sacarose, 30% (v/v) glicerol, 15% (v/v) etileno glicol e 15% (v/v) DMSO. A solução PVS3 é composta por 40% (v/v) de glicerol e 40% (v/v) de sacarose.

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).

### **2.2.3 Resfriamento**

O resfriamento do material vegetal pode ser realizado de forma rápida ou lenta. A escolha do método dependerá do material vegetal e da espécie.

### **2.2.4 Congelamento lento**

O protocolo através 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<sup>-1</sup> até que se atinjam temperaturas entre -30 e -40°C e depois o material é imerso diretamente no nitrogênio líquido a -196°C (FRIZZO, 2013).

Se a célula é congelada muito rapidamente não há tempo para a ocorrência da desidratação e a água livre mantém-se na solução intracelular do material, obtendo-se como resultado a formação de cristais de gelo que causam injúrias nas células (SANTOS, 2000).

A velocidade de congelamento é um fator determinante sobre a formação de cristais de gelo, formato e tamanho (CAVALCANTI MATA; BRAGA; SILVA, 2003). Quando os tecidos vegetais sofrem resfriamento lento, a exposição a temperaturas de congelamento por períodos prolongados leva a formação de cristais de gelo no meio extracelular, causando movimento da água do protoplasto para o gelo extracelular (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Santos (2001) explica que esse movimento de água ocorre devido a diminuição da pressão de vapor no meio extracelular a um nível mais baixo que a intracelular. Esse processo causa a difusão da água presente no interior das células para o meio extracelular, quando a água atinge o meio extracelular congela rapidamente resultando na desidratação.

Esse processo, chamado de desidratação induzida por congelamento (“freeze-induced desiccation”), faz a concentração 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 no interior das células e possa causar

danos. Portanto, depois de realizado esse processo corretamente o mergulho em nitrogênio líquido tem muito pouco efeito (GOLDFARB et al., 2010).

### **2.2.5 Congelamento rápido**

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

Em temperaturas menores que  $-130^{\circ}\text{C}$  existem apenas dois estados físicos nas células, o cristalino e o vítreo (KARTHA, 1985). As técnicas de criopreservação por congelamento rápido são baseadas na vitrificação. A vitrificação proporciona a formação de um estado sólido amorfo meta estável, chamado estado vítreo, que se difere do estado sólido cristalino, justamente por não haver a formação de cristais de gelo (PORTO, 2013). A obtenção do estado vítreo pode ser auxiliada por meio da realização de uma etapa de crioproteção previa ao congelamento, onde é feita a aplicação de substâncias crioprotetoras (FRIZZO, 2013).

Santos (2000) discorre que se pode obter o estado vítreo através da desidratação dos tecidos a um grau de umidade em que não haja água livre para formação de cristais de gelo antes da imersão da amostra em nitrogênio líquido. Assim o citoplasma celular torna-se superconcentrado e de alta viscosidade adquirindo as propriedades mecânicas de um sólido. Então quando a amostra é mergulhada em nitrogênio líquido o estado vítreo é obtido evitando a formação de cristais de gelo.

### **2.2.6 Armazenamento**

O armazenamento do material vegetal criopreservado é realizado em botijões ou tanques criogênicos contendo nitrogênio na sua fase líquida ou de vapor as quais apresentam aproximadamente de forma respectiva  $-196^{\circ}\text{C}$  e  $-150^{\circ}\text{C}$ . É importante manter o botijão criogênico abastecido com nitrogênio para garantir a manutenção da temperatura, caso contrário as sementes descongelam e o metabolismo volta a aumentar degradando as reservas.

### **2.2.7 Descongelamento**

O descongelamento do material vegetal 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).

Santos e Salomão (2010) cita como formas de descongelamento a exposição do material vegetal em banho-maria a temperatura próxima de  $40^{\circ}\text{C}$ , 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. Ainda existe a opção de realizar o descongelamento em forno micro-ondas.

No entanto, em pesquisa realizada com sementes de algodão criopreservadas a  $-170$  e  $-196^{\circ}\text{C}$ , Coelho (2006) constatou que o descongelamento a temperatura ambiente proporcionou melhores resultados para o vigor das sementes.

### 3 METODOLOGIA

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Vegetal e na Casa de Vegetação da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) *Campus* de Laranjeiras do Sul – Paraná. O trabalho foi dividido em quatro bioensaios, os três primeiros utilizando sementes de araucária e o quarto com sementes de pitanga.

#### 3.1 ORIGEM E OBTENÇÃO DAS SEMENTES

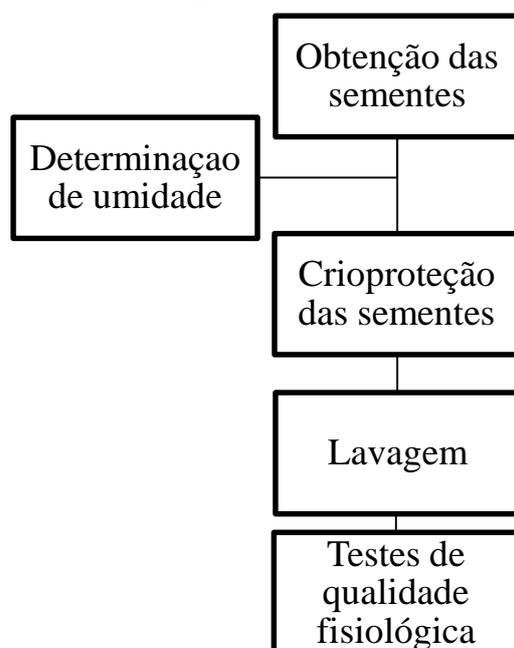
As sementes de *A. angustifolia* foram obtidas de agricultores do Faxinal Saudade Santa Anita no Município de Turvo – PR. Foram selecionadas sementes maduras e que não apresentassem as seguintes características: pinhões brotados, inchados ou com qualquer sinal de início de germinação, doentes, menores 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).

As sementes de pitanga foram obtidas de frutos colhidos no Município de Laranjeiras do Sul – PR. As sementes foram separadas dos frutos por meio de amassamento manual de modo que a polpa fosse separada das sementes.

### 3.2 EFEITO DE DIFERENTES CRIOPROTETORES NA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA

O bioensaio 1, realizado com sementes de araucária seguiu o esquema representado na imagem 2.

**Imagem 2.** Esquema metodológico utilizado no bioensaio 1.



**Fonte:** Andre da Silva Lefchak (2016).

As sementes de araucária foram imersas em soluções crioprotetoras de glicerol, sacarose e dextrose com diferentes concentrações de soluto. Os tratamentos foram os seguintes: testemunha imersa em água destilada, imersão em sacarose nas concentrações 0,5; 1 e 1,5 Mol.L<sup>-1</sup>, imersão em dextrose na concentração de 2 Mol.L<sup>-1</sup> e imersão em glicerol nas concentrações de 10; 20; 30 e 40% (v/v). Antes de submetidas a embebição as sementes receberam um corte na região oposta a micrópila para garantir que o tegumento não atrapalhasse a absorção dos crioprotetores pelos tecidos internos da semente. Todas as soluções foram aeradas por meio de uma bomba de aquário ligada a uma pedra porosa. As sementes permaneceram imersas nas soluções pelo período de 8 horas. Após este período as sementes foram lavadas por 15 segundos com agitação em 5 litros de água para remover o excesso de crioprotetores.

Posteriormente as sementes foram submetidas as seguintes avaliações: grau de umidade, emergência e índice de velocidade de emergência de plântulas. O índice de velocidade de emergência de plântulas foi realizado simultaneamente ao teste de emergência.

### 3.2.2 Determinação do grau de umidade das sementes de araucária

A determinação do grau de umidade das sementes de *Araucaria angustifolia* foi realizada pelo método padrão de estufa descrito na RAS para espécies florestais (BRASIL, 2009), a 105°C durante 24 horas. Foram utilizadas duas repetições de 5 sementes, que receberam dois cortes transversais e um corte longitudinal conforme metodologia de Santos (2014).

O cálculo de porcentagem de umidade em base úmida foi realizado conforme a equação 1:

$$\text{Equação 1. } U = \frac{P - p}{P - T} \cdot 100$$

Onde P é a massa inicial (g), p é a massa final (g) e T é a massa do recipiente (g).

### 3.2.3 Teste de emergência e índice de velocidade de emergência de plântulas

O teste de emergência e Índice de Velocidade de Emergência (IVE) de plântulas foi realizado com quatro repetições de 25 sementes por tratamento. A semeadura foi realizada em bandejas plásticas (dimensões: 42,2cm comprimento x 34cm largura x 8,4cm altura; capacidade para 9 litros) com 6 L de areia. A areia foi previamente peneirada em malha de 2 mm e autoclavada a 120° C por 15 min. As sementes foram semeadas no substrato com inclinação de aproximadamente 45°. As bandejas permaneceram em casa de vegetação regulada com temperatura de 25±2°C por 62 dias e receberam duas irrigações diárias de 4 minutos cada, por sistema de aspersão, uma as 9:00 horas e outra as 14:00 horas. Foi utilizado fotoperíodo natural.

A partir do vigésimo dia após a semeadura foram iniciadas as observações de emergência das plântulas a fim de realizar o Índice de Velocidade de Emergência (IVE), as observações foram feitas três vezes por semana (segunda-feira, quarta-feira e sexta-feira), levando em consideração o surgimento de qualquer estrutura das plântulas acima do nível do substrato conforme metodologia utilizada por Santos (2014) com adaptações.

Para realização do cálculo do índice de velocidade de emergência (IVE) foi utilizada a fórmula proposta por Maguire (1962).

$$\text{Equação 2. } IVE = \frac{E_1}{N_1} + \frac{E_2}{N_2} + \dots + \frac{E_n}{N_n}$$

Onde  $E_n$  é o número de plântulas normais computadas na 1ª, 2ª, 3ª... até a última contagem e  $N_n$  é o número de dias após a semeadura relacionado a cada contagem.

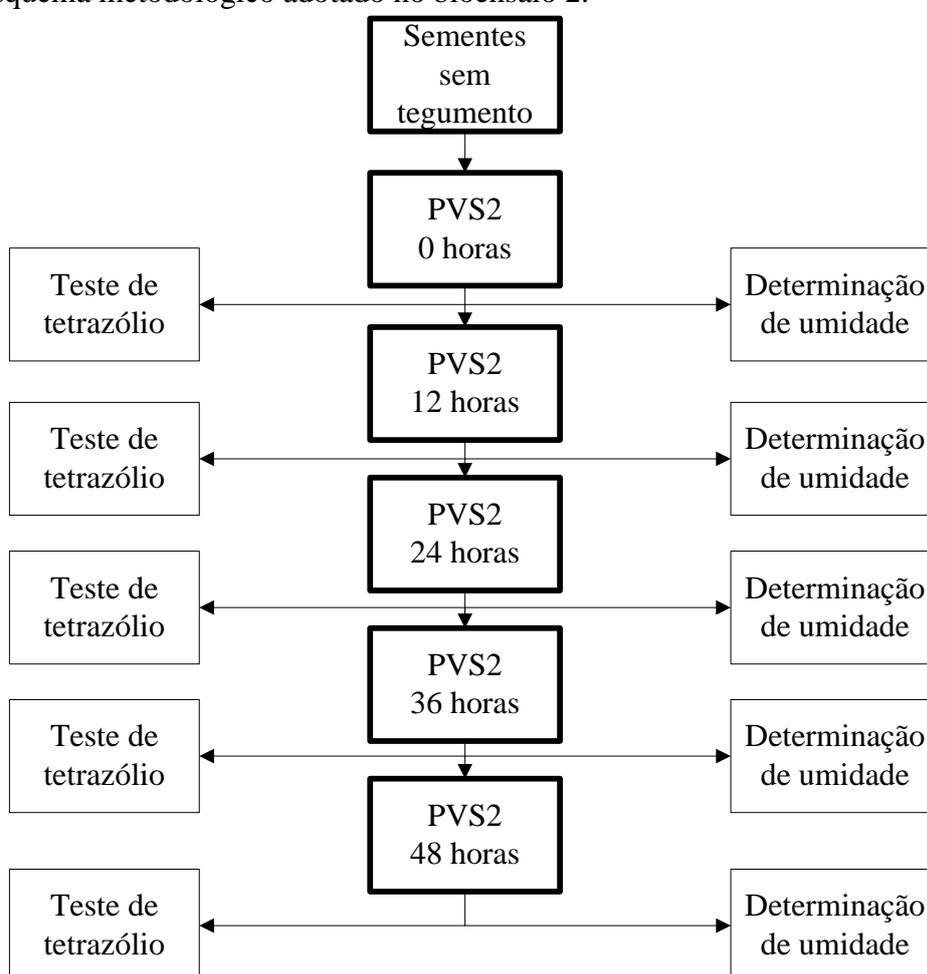
### 3.2.4 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições de 25 sementes por tratamento. O bioensaio foi constituído pelos seguintes tratamentos: sementes imersas em água destilada (testemunha), imersão em sacarose nas concentrações 0,5; 1 e 1,5 Mol.L<sup>-1</sup>, imersão em dextrose na concentração de 2 Mol.L<sup>-1</sup> e imersão em glicerol nas concentrações de 10; 20; 30 e 40% (v/v). Os resultados foram submetidos a análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de significância utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

### 3.3 EFEITO DE DIFERENTES PERÍODOS DE IMERSÃO EM PVS2 SOBRE O GRAU DE UMIDADE E A QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA

As sementes de araucária tiveram o tegumento removido e, em seguida, foram imersas em solução de PVS2 (glicerol 30%, etileno glicol 15%, dimetilsulfóxido 15% e sacarose 0,4 Mol.L<sup>-1</sup>) pelos períodos de 0, 12, 24, 36 e 48 horas. A imersão foi realizada em bandeja com aeração fornecida por uma bomba de aquário ligada a uma pedra porosa. Concluído os períodos de imersão em PVS2 realizou-se a determinação do grau de umidade das sementes e o teste de tetrazólio conforme imagem 3.

**Imagem 3.** Esquema metodológico adotado no bioensaio 2.



Fonte: Andre da Silva Lefchak (2016).

#### 3.3.1 Determinação de umidade das sementes de araucária

A determinação de umidade das sementes de *Araucaria angustifolia* foi realizada pelo método padrão de estufa descrito na RAS para espécies florestais (BRASIL, 2009), a 105°C durante 24 horas. Foram utilizadas duas repetições de 5 sementes sem tegumento, que

receberam dois cortes transversais e um corte longitudinal conforme metodologia de Santos (2014).

### **3.3.2 Teste de tetrazólio**

O teste de tetrazólio foi realizado embebendo as sementes em água destilada por 18 horas. Depois os embriões das sementes de araucária foram excisados e imersos em solução contendo sal de tetrazólio a 0,075%. Utilizou-se 4 repetições de 25 embriões. Esse material foi levado a BOD e permaneceu por 4 horas a 30° C sem fotoperíodo. Após esse período os embriões foram enxaguados em água destilada e avaliou-se a viabilidade, com o auxílio de um estereoscópio. A viabilidade dos embriões foi classificada conforme a metodologia proposta por Oliveira et al., (2014).

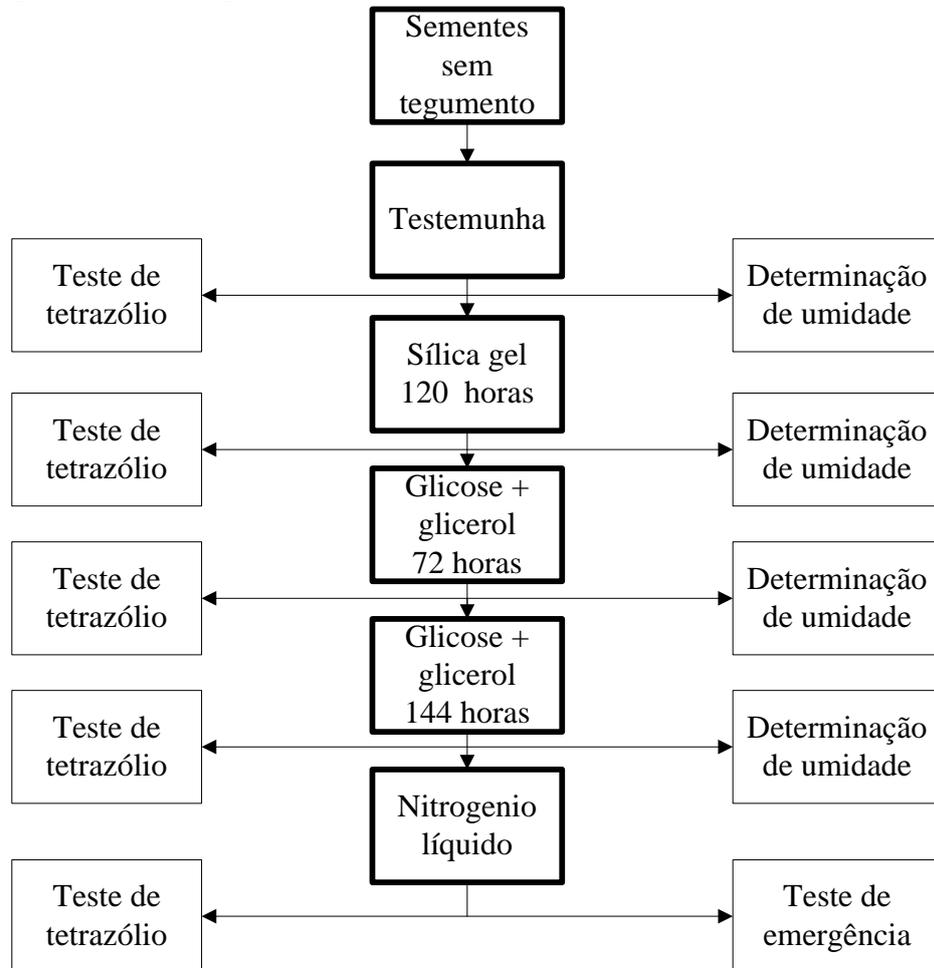
### **3.3.3 Delineamento experimental e análise estatística**

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 5 tratamentos: imersão em solução PVS2 por 0, 12, 24, 36 e 48 horas. Cada tratamento conteve 4 repetições de 25 sementes. 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 EFEITO DA SILICA GEL, PERÍODOS DE IMERSÃO EM GLICOSE (60%) + GLICEROL (15%) E CONGELAMENTO EM NITROGÊNIO SOBRE QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA

A imagem 4 esquematiza o procedimento metodológico do bioensaio 3.

**Imagem 4.** Esquema metodológico adotado no bioensaio 3.



**Fonte:** Andre da Silva Lefchak (2016).

As sementes de araucária tiveram o tegumento removido e, em seguida, foram colocadas em dessecador contendo 800g de sílica gel, a qual foi trocada sempre que se observou o início de mudança de cor do material, o que totalizou 3 vezes. As sementes permaneceram em dessecador com sílica gel por um período de 120 horas. Depois de retiradas da sílica gel as sementes foram imersas em solução de glicose (60%) + glicerol (15%) pelos períodos de 72 e 144 horas. A imersão das sementes na solução foi realizada em bandeja com aeração fornecida por uma bomba de aquário ligada a uma pedra porosa. A cada período de imersão em glicose (60%) + glicerol (15%) as sementes foram lavadas em água corrente por 1

minuto, depois secas em papel germiteste por 3 minutos e seguiram para a determinação do grau de umidade e o teste de tetrazólio.

Também foi realizada a criopreservação das sementes. Depois de concluída toda a sequência de tratamento nas sementes sem o tegumento (secagem em sílica gel por 120 horas, imersão na solução de glicose 60% + glicerol 15% pelo período de 144 horas), foram colocadas dentro de tubos falcon de 50 ml e imersas em nitrogênio líquido por um período de 2 horas.

O descongelamento das sementes foi realizado colocando-se os tubos falcon em banho-maria a 40°C por 1 hora.

#### **3.4.1 Determinação de umidade das sementes de araucária**

A determinação de umidade das sementes de *Araucaria angustifolia* foi realizada com sementes marcadas para acompanhar alterações na massa das sementes em cada tratamento. Adotou-se o método padrão de estufa descrito na RAS para espécies florestais (BRASIL, 2009), a 105°C durante 24 horas. Foram utilizadas duas repetições de 5 sementes sem tegumento, que receberam dois cortes transversais e um corte longitudinal conforme metodologia de Santos (2014).

#### **3.4.2 Teste de tetrazólio**

O teste de tetrazólio foi realizado embebendo as sementes em água destilada por 18 horas. Depois os embriões das sementes de araucária foram excisados e imersos em solução contendo sal de tetrazólio a 0,075%. Utilizou-se 4 repetições de 25 embriões. Esse material foi levado a BOD e permaneceu por 4 horas a 30° C sem fotoperíodo. Após esse período os embriões foram enxaguados em água destilada e avaliou-se a viabilidade, com o auxílio de um estereoscópio. A viabilidade dos embriões foi classificada conforme a metodologia proposta por Oliveira et al., (2014).

#### **3.4.3 Teste de emergência de plântulas**

Após a criopreservação foi realizado o teste de emergência com quatro repetições de 25 sementes. A semeadura foi realizada em bandejas plásticas (dimensões: 42,2cm comprimento x 34cm largura x 8,4cm altura; capacidade para 9 litros) com 6 L de areia. A areia foi previamente peneirada em malha de 2 mm e autoclavada a 120° C por 15 min. As sementes foram semeadas no substrato com inclinação de aproximadamente 45°. As bandejas permaneceram em casa de vegetação regulada com temperatura de 25±2°C por 62 dias e

receberam duas irrigações diárias de 4 minutos cada, por sistema de aspersão, uma as 9:00 horas e outra as 14:00 horas. O fotoperíodo utilizado foi o natural.

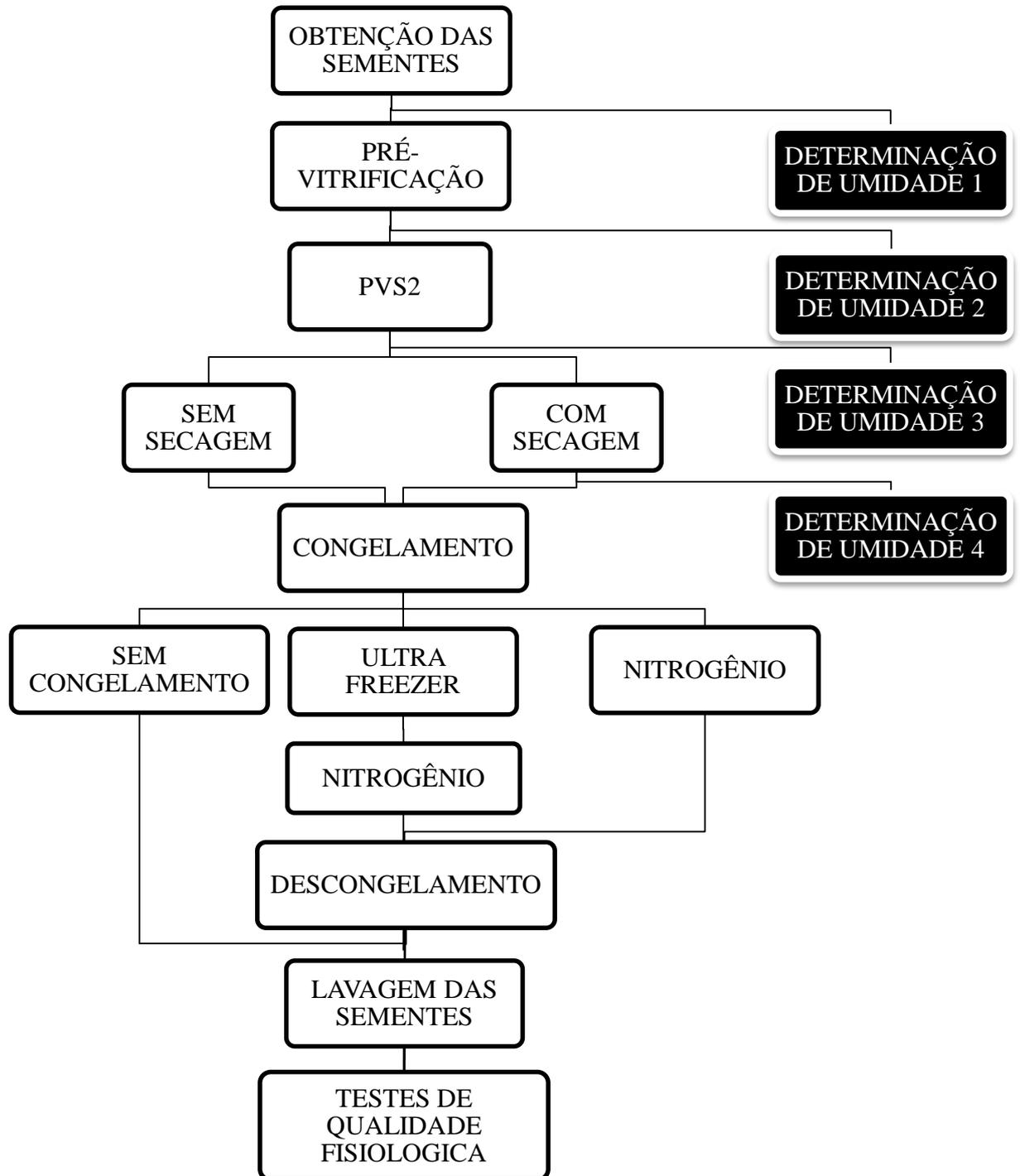
#### **3.4.4 Delineamento experimental e análise estatística**

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 5 tratamentos: testemunha; sílica gel por 120 horas; sílica gel por 120 horas + imersão em solução de glicose (60%) + glicerol (15%) por 72; sílica gel por 120 horas + imersão em solução de glicose (60%) + glicerol (15%) por 144 horas e sílica gel por 120 horas + imersão em solução de glicose (60%) + glicerol (15%) por 144 horas + imersão em nitrogênio líquido por 2 horas. Cada tratamento conteve 4 repetições de 25 sementes. 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 EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO EM SEMENTES DE PITANGA**

O experimento com sementes de pitanga foi realizado conforme o esquema representado na imagem 5.

**Imagem 5.** Esquema metodológico adotado no bioensaio 4.



**Fonte:** Andre da Silva Lefchak (2016).

### **3.5.1 Pré-vitrificação das sementes de pitanga**

A crioproteção de sementes de pitanga foi realizada em solução de glicerol 2 Mol.L<sup>-1</sup> + sacarose 0,4 Mol.L<sup>-1</sup> por uma hora, em seguida as sementes foram imersas em solução PVS2 composta de glicerol 30%, etileno glicol 15%, dimetilsulfóxidos 15% e sacarose 0,4 Mol.L<sup>-1</sup> por um período de 6 horas. Durante a imersão das sementes as soluções foram aeradas por uma bomba de aquário ligada a uma pedra porosa.

### **3.5.2 Secagem das sementes**

Após a crioproteção parte das sementes foram secadas em estufa com ventilação forçada a 35 °C pelo período de 144 horas enquanto que a outra metade não recebeu secagem.

### **3.5.3 Congelamento**

As sementes secadas e não secadas em estufa foram divididas em três porções para serem submetidas aos diferentes tipos de congelamento: rápido, lento e sem congelamento. No congelamento rápido as sementes foram imersas em nitrogênio líquido - 196°C pelo período de 30 minutos. O congelamento lento foi realizado em ultrafreezer até que as sementes atingissem temperatura próxima a - 40°C seguido de imersão em nitrogênio líquido - 196°C pelo período de 30 minutos.

Tanto para o congelamento lento quanto para o rápido, as sementes foram colocadas em tubos Falcon de 50 ml e esses tubos foram colocados dentro de canisters antes de serem imersos no nitrogênio.

A velocidade de resfriamento no congelamento lento foi verificada utilizando um termo-higrógrafo digital. O sensor do aparelho foi colocado no interior de um tubo Falcon preenchido com sementes e então levado ao ultrafreezer até a temperatura atingir - 40°C.

### **3.5.4 Descongelamento**

As sementes de pitanga congeladas em nitrogênio líquido foram descongeladas nos tubos Falcon em banho-maria a 37 °C com rotação por 30 minutos.

### **3.5.5 Lavagem das sementes**

Depois de cada tratamento as soluções crioprotetoras foram removidas das sementes por meio de lavagem. A lavagem foi realizada por um minuto em 300 ml de água destilada seguida de enxágue por mais um minuto em 200 ml de água destilada, ambos os processos

foram realizados com agitação. Depois da lavagem, as sementes seguiram para as avaliações de qualidade fisiológica.

As sementes foram submetidas a determinação de umidade, teste de protrusão radicular e germinação, teste de condutividade elétrica e ao teste de tetrazólio.

### **3.5.6 Determinação de umidade das sementes de pitanga**

A determinação de umidade das sementes de *Eugenia uniflora* foi realizada pelo método padrão de estufa descrito na RAS (BRASIL, 2009), a 105°C durante 24 horas.

Foi determinada a umidade das sementes após a despolpa, depois da imersão na solução de glicerol + sacarose, depois da imersão na solução de PVS2 e após a secagem em estufa. Foram utilizadas duas repetições, com peso inicial conhecido de 10g, por tratamento.

### **3.5.7 Protrusão radicular e germinação de sementes de pitanga**

Os testes de protrusão radicular e de germinação foram realizados simultaneamente, conduzidos utilizando-se quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento. As sementes foram distribuídas em rolos de papel Germitest, umedecidos com água destilada na quantidade de 2,5 vezes a massa do substrato seco. Todas as sementes foram dispostas com uma estria de coloração mais clara que predomina no sentido longitudinal das sementes voltada para a face inferior do papel, conforme demonstra a imagem 6. Os rolinhos foram mantidos por 33 dias em germinador tipo Mangesdorf regulado a temperatura constante de 25 °C.

**Imagem 6.** Montagem do teste de germinação em papel germitest com estria das sementes de pitanga voltada a face inferior do papel.



**Foto:** Andre da Silva Lefchak (2016).

Considerou-se protrusão radicular a emissão de raiz primária maior que 2mm, a qual foi medida com auxílio de um paquímetro.

Considerou-se germinadas as sementes que formaram plântulas normais aos 33 dias. Foram contadas as plântulas normais, anormais, mortas e dormentes.

### **3.5.8 Teste de condutividade elétrica**

O teste de condutividade elétrica foi realizado com 100 sementes, 4 repetições de 25 sementes de cada tratamento.

As sementes de cada repetição foram pesadas e colocadas em beckers com capacidade de 100 ml, que continham 75 ml de água destilada, então esse material permaneceu 24 horas em BOD a 25°C. Depois das 24 horas imersas em água destilada foi feita a leitura da condutividade elétrica. Antes da leitura o condutímetro foi calibrado e as amostras agitadas 20 vezes em sentido horário e mais 20 no sentido anti-horário, seguido da leitura por meio de condutímetro. Os resultados da condutividade elétrica foram expressos em  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ .

### **3.5.9 Teste de tetrazólio com sementes de pitanga**

O teste de tetrazólio foi realizado somente com as sementes que não apresentaram protrusão da radícula no teste de germinação. Utilizou-se 52 sementes por tratamento, retirando-se 13 sementes de cada repetição do teste de germinação. As sementes foram

cortadas em duas metades sobre a estria de coloração mais clara da semente conforme a imagem 7. Uma das metades de cada semente foi colocada em tubos Falcon com capacidade para 50 ml e imersas em 6 ml de solução contendo sal de tetrazólio a 0,5%. Esse material foi levado a BOD e permaneceu por 4 horas a 25° C sem fotoperíodo. Após esse período as sementes foram enxaguadas em água destilada e avaliou-se a viabilidade, com o auxílio de um estereoscópio.

**Imagem 7.** Corte de sementes de pitanga para realização do teste de tetrazólio.

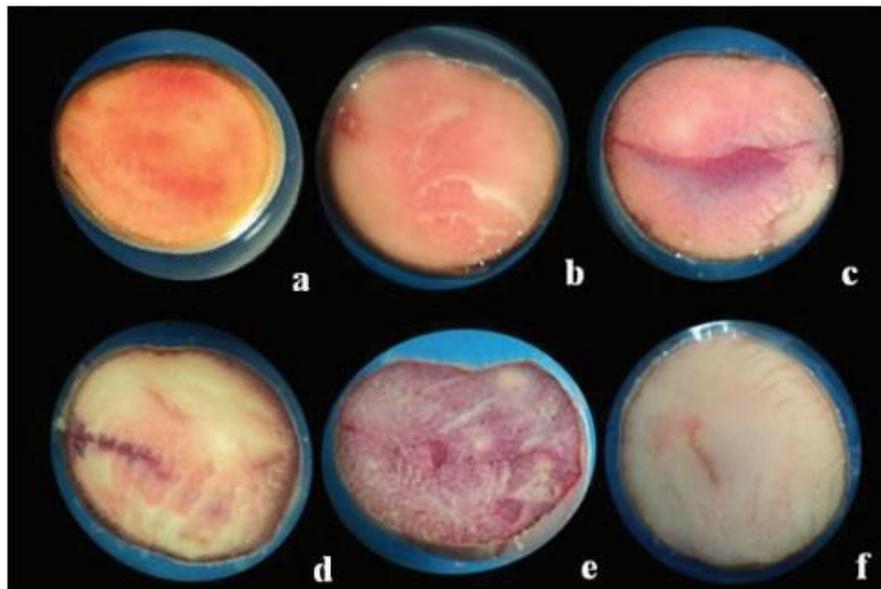


Seta vermelha indica a estria de coloração mais clara presente nas sementes de pitanga.

Fotos: Andre da Silva Lefchak (2016).

As sementes foram classificadas de acordo com a escala de viabilidade de sementes de *Eugenia uniflora* para o teste de tetrazólio proposta por Kaiser et al. (2014) representado na Imagem 8.

**Imagem 8.** Classes de viabilidade de Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) encontrados em teste de tetrazólio.



(a) Sementes viáveis com cor rosa claro homogênea; (b e c) Sementes viáveis com a cor rosa claro em mais de 50% do tecido do embrião, manchas vermelhas, brancas e púrpuras; (d) Sementes não viáveis, com mais de 50% do tecido embrionário em cor branca e púrpura intensa, bordas vermelho acastanhado; (e) Sementes não viáveis com cor carmim intensa, vermelho escuro acastanhado; (f) Sementes não viáveis, semente sem coloração.

Fonte: Kaiser et al. (2014) traduzido.

### **3.5.10 Delineamento experimental e análise estatística**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 7 tratamentos: Testemunha; Sem secagem e sem congelamento; Sem secagem e com congelamento em ultrafreezer; Sem secagem e com congelamento em nitrogênio líquido; Com secagem e sem congelamento; Com secagem e com congelamento em ultrafreezer; Com secagem e com congelamento em nitrogênio líquido;

O teste de condutividade elétrica foi realizado com 4 repetições de 25 sementes por tratamento, o teste de protrusão radicular e germinação foram realizados com 4 repetições de 50 sementes por tratamento e o teste de tetrazólio foi realizado com 4 repetições de 13 sementes por tratamento.

Os resultados dos testes foram submetidos a análise de variância e a comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de significância utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

Os resultados dos testes que não foram passíveis de realizar análise de variância e teste de comparação de médias foram apresentados em porcentagem.

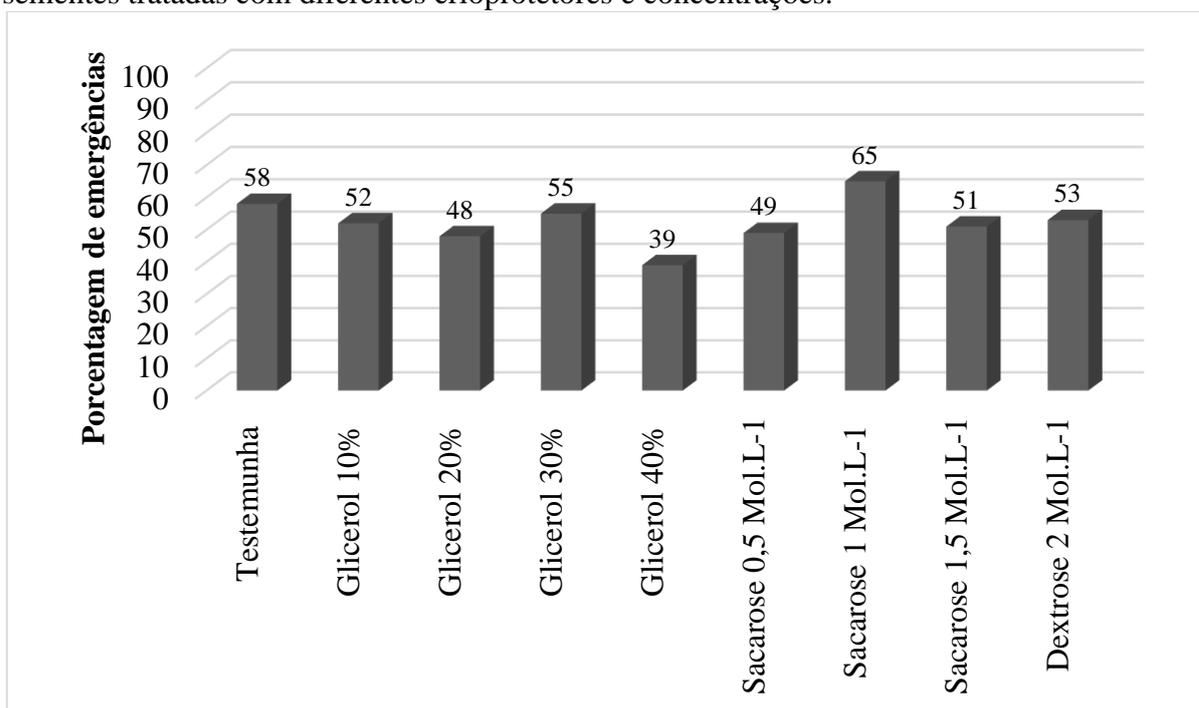
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 EFEITO DE DIFERENTES CRIOPROTETORES NA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA

A umidade das sementes de araucária foi de 50%, acima da observada por Santos (2014) e Carrillo et al., (2003) que observaram médias de umidade de 45% durante o armazenamento das sementes. Vale ressaltar que o grau de umidade das sementes foi superior a 37%, nível crítico, cuja a diminuição causa a inviabilidade da semente (TOMPSETT, 1984).

Pelo gráfico 1 observa-se que a porcentagem de emergência de plântulas não foi afetada pelo tratamento com crioprotetores independentemente da concentração utilizada, cujo valor percentual da testemunha não diferiu significativamente dos demais tratamentos. Sugerindo que nenhum dos tratamentos causou efeito negativo sobre a emergência de plântulas de araucária.

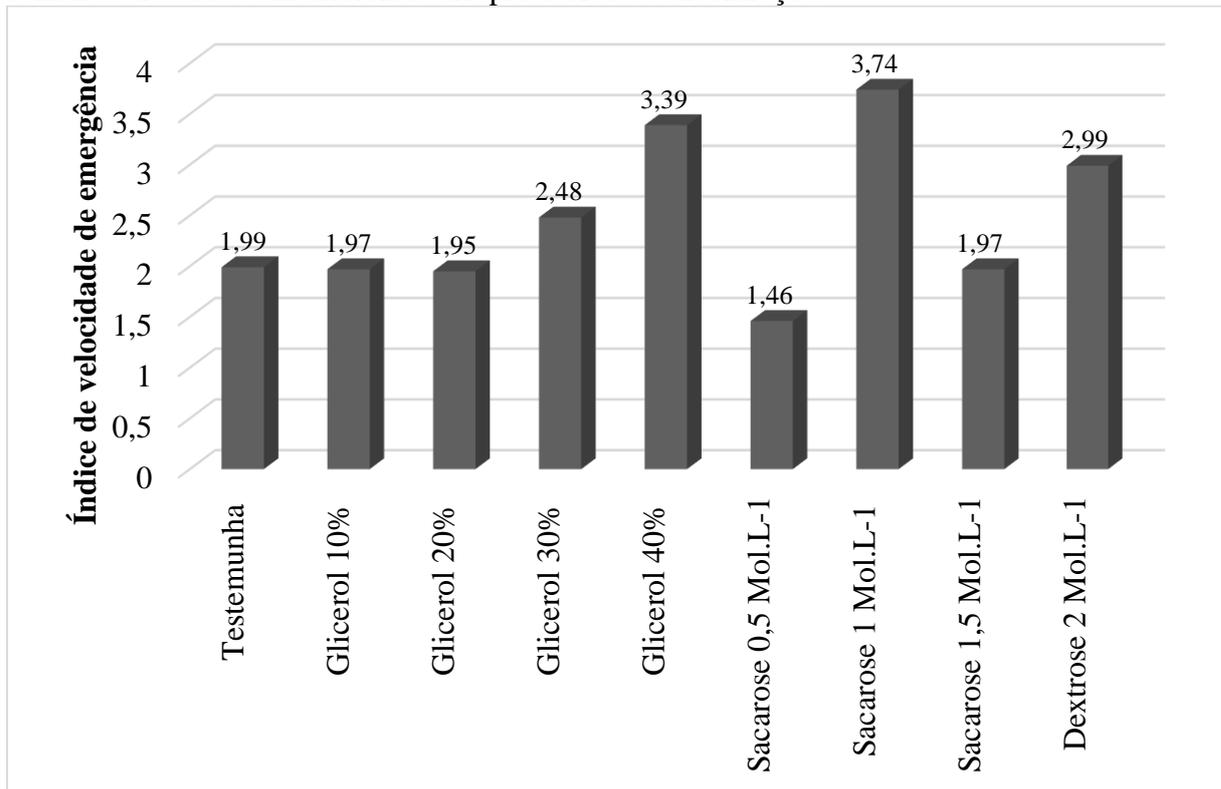
**Gráfico 1.** Porcentagem média de emergência de plântulas de araucária obtidas a partir de sementes tratadas com diferentes crioprotetores e concentrações.



Todavia, nota-se que a porcentagem de emergência de plântulas foi baixa, 58% para a testemunha. Garcia et al., (2014) obtiveram o valor de 90% para a germinação inicial de sementes de araucária. Esse contraste mostra que talvez as sementes ainda não tivessem atingido o ponto de maturidade fisiológico, visto que, estas haviam sido colhidas na pinha e muitas ainda apresentavam coloração clara, aparentando ainda estarem verdes, porém próximas da maturidade fisiológica.

Pelo gráfico 2 observa-se que os tratamentos também não causaram nenhum efeito negativo no vigor das sementes, pois não houve diferença significativa para o Índice de Velocidade de Emergência de plântulas entre os diferentes tratamentos quando comparados pelo teste de Tukey a 5% de significância.

**Gráfico 2.** Índice de velocidade de emergência de plântulas de araucária obtidas a partir de sementes tratadas com diferentes crioprotetores e concentrações.

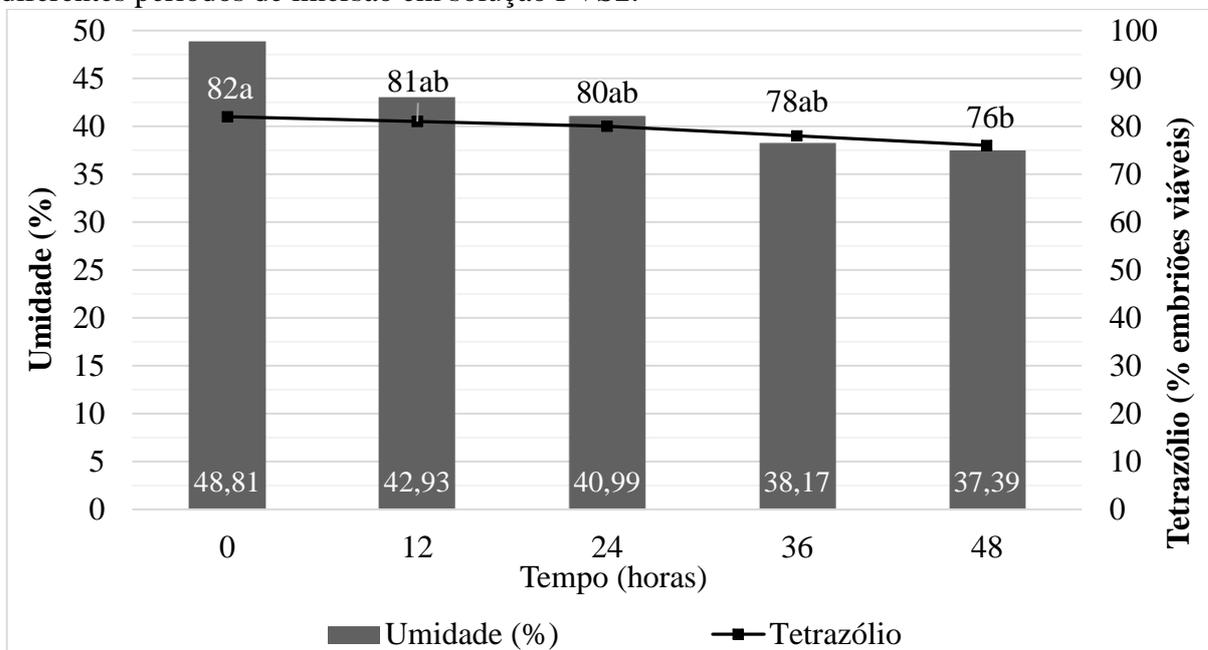


Estes resultados sugerem a possibilidade de utilização destes solutos como crioprotetores em sementes de araucária, pois não causam nenhum prejuízo a qualidade fisiológica das sementes. Segundo Walters et al., (2008), a maioria das sementes recalcitrantes é capaz de sobreviver a exposição de curto prazo (algumas horas) de tensões de água próximas a -12 MPa. A este potencial hídrico as transições de congelamento são severamente limitadas e só uma quantidade diminuta de água é capaz de formar cristais de gelo se resfriadas à -80° C. Os tratamentos que mais se aproximaram deste valor de potencial hídrico e, portanto, provavelmente sejam os mais indicados para uso como crioprotetores para a criopreservação de sementes de araucária são glicerol a 40%, sacarose a 1,5 Mol.L<sup>-1</sup> e dextrose 2 Mol.L<sup>-1</sup>, pois apresentam respectivamente os potenciais hídrico de -13,5 MPa, -3,7 MPa e -4,9 MPa. Muitos protocolos de criopreservação de sementes recalcitrantes fazem uso da aparente correlação entre o potencial hídrico crítico que limita os danos a dessecação e a formação de cristais de gelo na água (VERTUCCI et al., 1991).

#### 4.2 EFEITO DE DIFERENTES PERÍODOS DE IMERSÃO EM PVS2 SOBRE O GRAU DE UMIDADE E A QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA

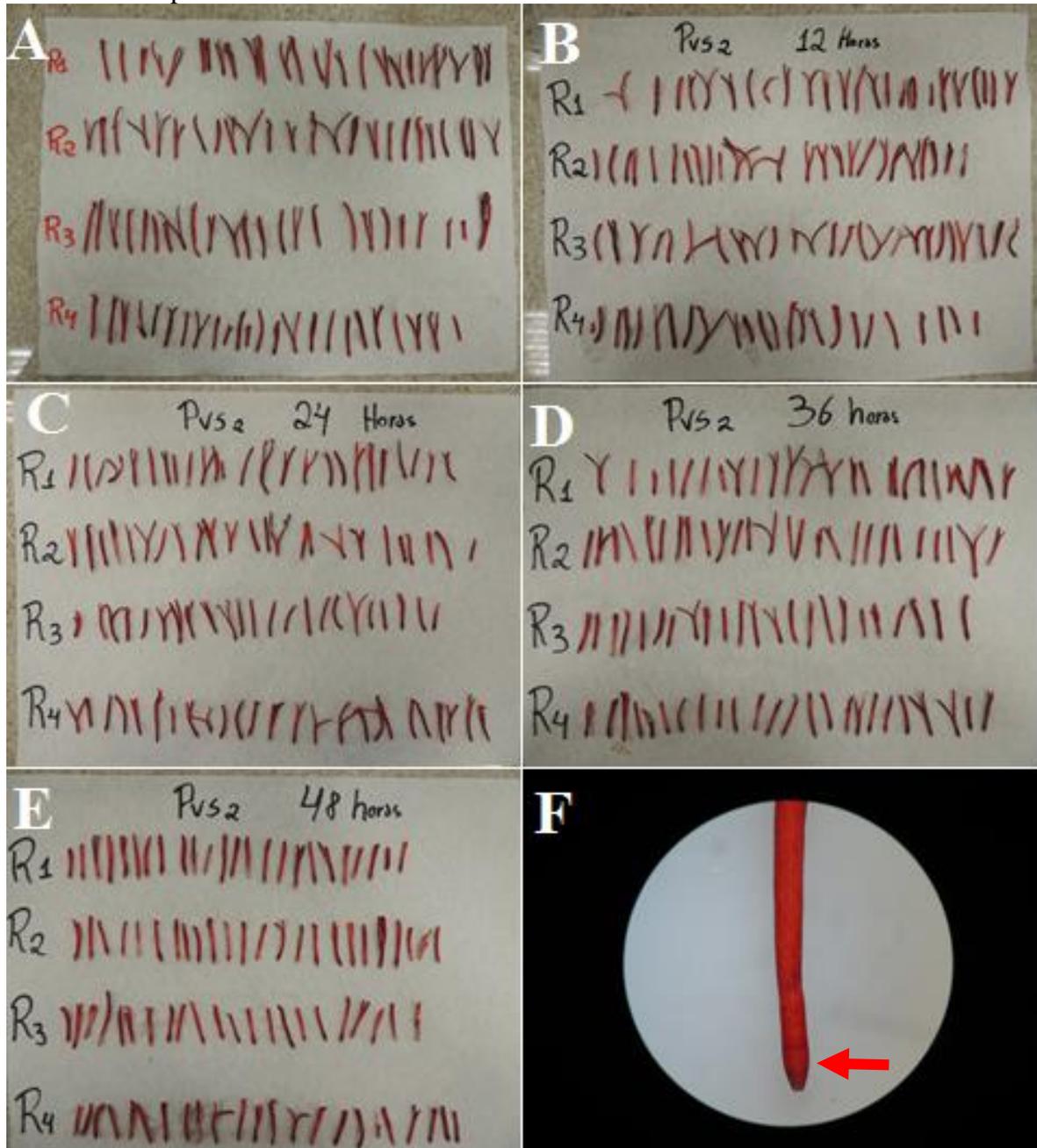
A umidade inicial das sementes de araucária sem tegumento foi de 48,81% e a viabilidade de 82%. Pelo gráfico 3 é possível notar que a medida que as sementes permaneceram na solução de PVS2 o grau de umidade das sementes e a viabilidade dos embriões reduziram. Nas primeiras horas de imersão em PVS2 houve maior redução no grau de umidade das sementes do que nas horas seguintes. A imersão até 12 horas causou diminuição de umidade maior do que os demais tempos.

**Gráfico 3.** Viabilidade de embriões de *Araucaria angustifolia*, estimada pelo teste de tetrazólio, em função da porcentagem de umidade das amêndoas das sementes obtidos por diferentes períodos de imersão em solução PVS2.



A imersão em PVS2 por 12, 24 e 36 horas causou redução na viabilidade dos embriões para 81, 80 e 78%, respectivamente, porém sem diferença significativa para a porcentagem de viabilidade no tempo zero. Houve redução significativa na viabilidade dos embriões apenas para o tratamento imerso em PVS2 por 48 horas, porém não se diferiu da imersão por 12, 24 e 36 horas. A imagem 9 ilustra o resultado do teste de tetrazólio dos embriões de araucária.

**Imagem 9.** Embriões de sementes de araucária imersos em solução de PVS2 por diferentes períodos de tempo e coloridos com sal de tetrazólio.



Resultado do teste de tetrazólio de sementes de araucária imersas em PVS2 por: A - 0 horas; B - 12 horas; C - 24 horas; D - 36 horas e E - 48 horas; F- eixo embrionário na extremidade inferior (indicado na seta) colorido em sal de tetrazólio observado em estereoscópio.

**Fotos:** Tiago Scolari (2016).

Fenômeno parecido foi observado em experimento realizado por Galdiano júnior (2013) que expôs sementes de orquídea (*Dendrobium* sp.) a solução de PVS2 pelos períodos de 0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 e 6 horas e as criopreservou em nitrogênio líquido por 1 hora. Os seus resultados demonstraram que a imersão no intervalo de 1 a 3 horas proporcionou maiores porcentagens de germinação, de 51 a 58% e exposições por tempos maiores reduziram a germinação das sementes.

Quando as sementes permaneceram por 36 e 48 horas no PVS2 a umidade foi respectivamente 38,17% e 37,39%. Eira (1994) discorre que a umidade crítica para sementes de araucária sem tegumento é de 39%, pois abaixo disso ocorre perda total da viabilidade das sementes. No entanto, é possível observar que com as umidades obtidas em 36 e 48 horas de imersão em PVS2 a viabilidade dos embriões de araucária ainda foram altas 78% e 76%, mostrando resultados diferentes de tal afirmação. Por outro lado, alguns autores relatam que a viabilidade de sementes de araucária não é afetada até 37% (TOMPSETT, 1984) ou 36% de umidade (BIANCHETTI; RAMOS, 1981). Nesses últimos casos, a umidade obtida nos tratamentos do experimento estaria acima da umidade crítica relatada por tais autores, justificando a manutenção da alta viabilidade dos embriões.

Galdiano Júnior (2013) discorre que a desidratação causada por PVS2 é muito importante para realizar a criopreservação, pois o grau de umidade é um fator determinante para evitar a formação de cristais de gelo e garantir a sobrevivência do material. Sakai; Hirai; Niino (2008) explicam que o ajuste do tempo de imersão na solução PVS2 é um fator importante para que as plantas possam sobreviver após a vitrificação, pois é preciso cuidado nos procedimentos de desidratação e prevenção de possíveis injúrias pela toxicidade dos crioprotetores e estresse osmótico da desidratação.

Desse modo, a redução da viabilidade observada no experimento com sementes de araucária pode ter sido em função da redução de umidade, que é prejudicial as sementes recalcitrantes. Ou também pode ter sido em função da exposição a solução de PVS2 por períodos prolongados, o que pode ter causado efeito fitotóxico. Carvalho e Otoni (2010) explicam que os crioprotetores podem causar toxidez ou estresse osmótico nas células. Molina et al. (2006) verificaram que sementes de cebola criopreservadas apresentaram redução na qualidade fisiológica em função do uso de crioprotetores.

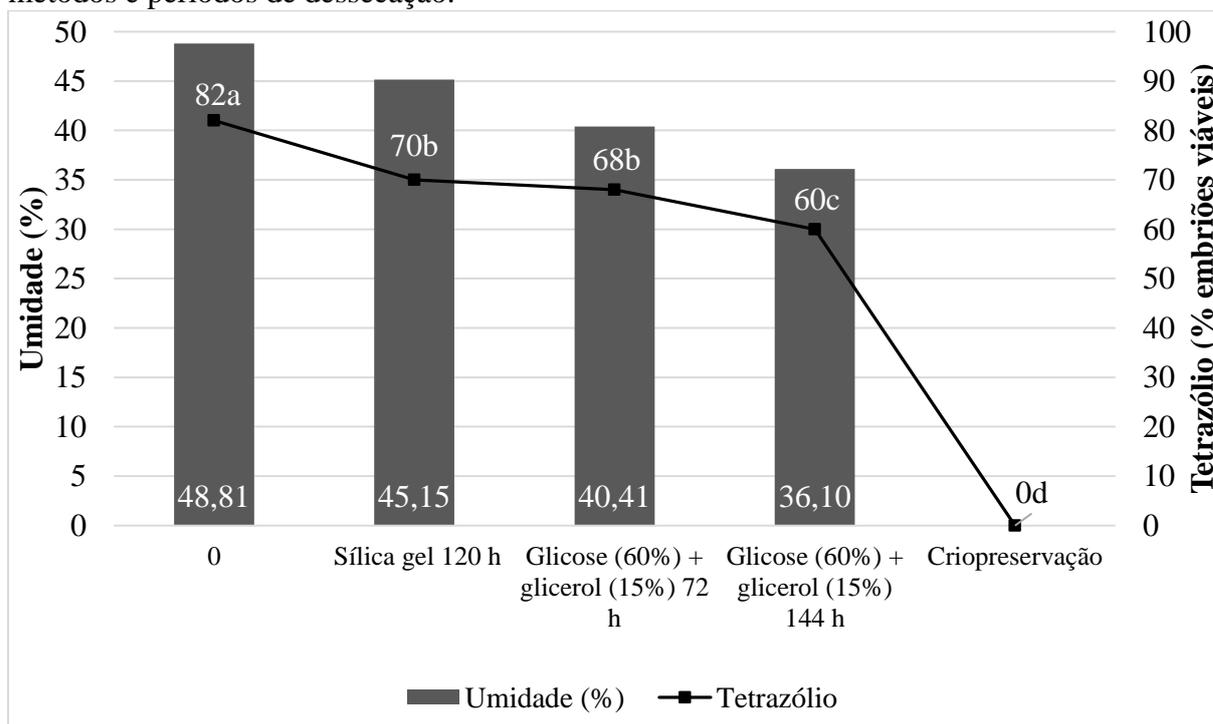
Alguns autores atribuem a toxidez da solução de PVS2 ao componente dimetilsulfóxido, o qual é permeável as membranas celulares. Ranzani (2015) verificou que a crioproteção com dimetilsulfóxido a 7%, causou efeito negativo sobre o vigor de sementes de maracujá (*Passiflora suberosa* L.).

Por outro lado, o mesmo dimetilsulfóxido é considerado por muitos autores como essencial à criopreservação por apresentar baixa toxidez ou atoxidez (RANZANI, 2015). 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).

#### 4.3 EFEITO DA SILICA GEL, PERÍODOS DE IMERSÃO EM GLICOSE (60%) + GLICEROL (15%) E CONGELAMENTO EM NITROGÊNIO SOBRE QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA

As sementes utilizadas no bioensaio 3 vieram do mesmo lote do bioensaio 2, portanto a umidade e a viabilidade inicial indicadas no gráfico 4 foram as mesmas, 48,81% de umidade e 82% de viabilidade. A testemunha apresentou maior viabilidade de embriões do que os demais tratamentos. Por outro lado, o tratamento com dessecação por 120 horas em sílica gel não diferiu daquele com dessecação por 120 horas em sílica gel + imersão em glicose (60%) + glicerol (15%) por 72 horas, entretanto, diferiram dos demais tratamentos. A imersão em solução de glicose (60%) + glicerol (15%) por 144 horas reduziu a viabilidade dos embriões para 60% diferindo significativamente da imersão em glicose (60%) + glicerol (15%) por 72 horas.

**Gráfico 4.** Viabilidade de embriões de *Araucaria angustifolia*, submetidos ao teste de tetrazólio, em função de níveis de umidade das amêndoas das sementes obtidos por diferentes métodos e períodos de dessecação.

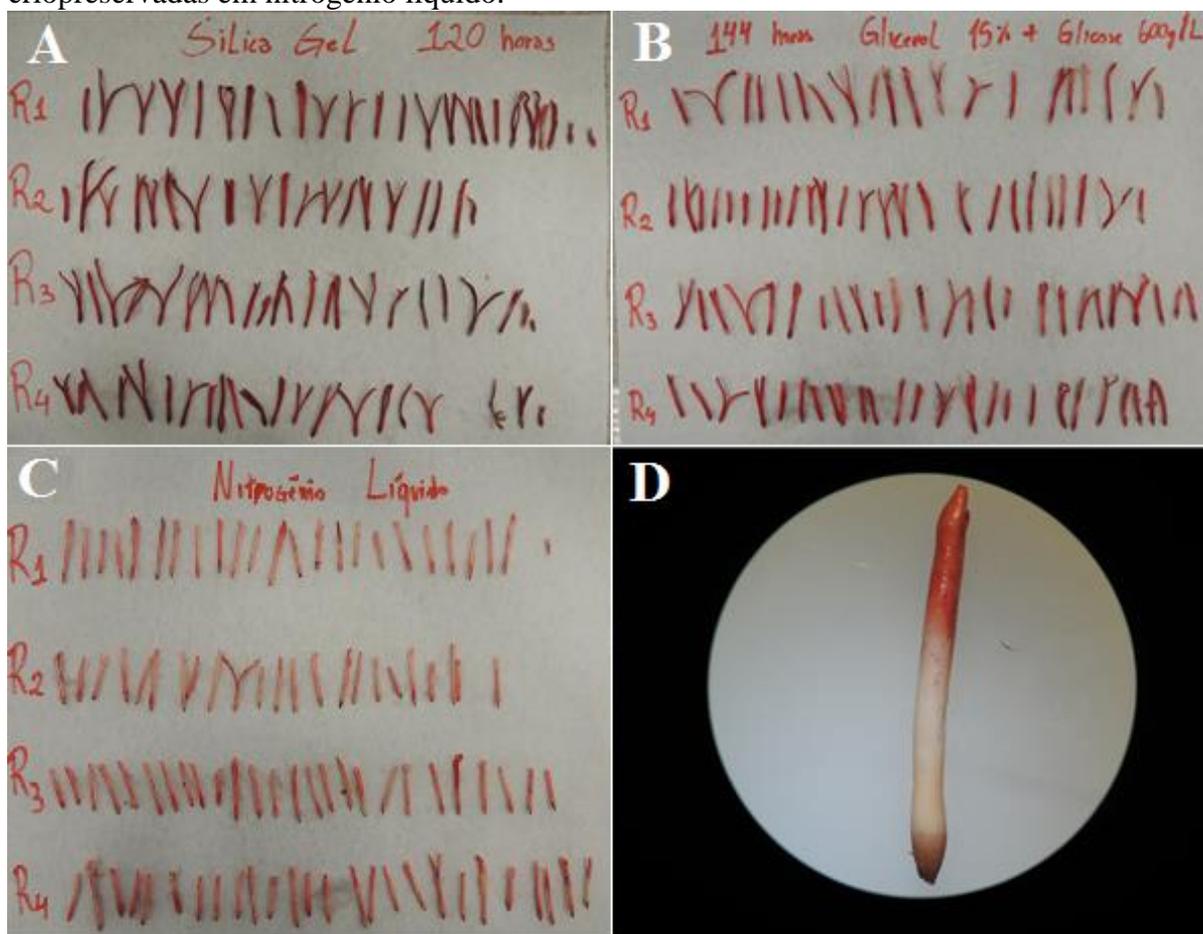


Quando os embriões foram criopreservados em nitrogênio líquido houve perda total da viabilidade dos mesmos, causando diferença significativa desse tratamento em relação a todos os demais, com a pior média, 0% de viabilidade e de emergência. Portanto, não foi possível criopreservar os embriões de araucária com essa sequência de tratamentos, provavelmente,

por danos causados pela formação de cristais de gelo no interior das células (TAIZ e ZEIGER, 2013).

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 (OLIVEIRA et al., 2014). Na imagem 10 pode-se visualizar o resultado do teste de tetrazólio realizado com as sementes de araucária. Na imagem 10 A e 10 B os embriões apresentaram coloração rósea, indicando a viabilidade dos tecidos. No entanto, nas imagens 10 C e 10 D observa-se que após a criopreservação os embriões ficaram brancos, indicando que os tecidos não estavam mais respirando e, portanto, estavam inviáveis.

**Imagem 10.** Teste de tetrazólio realizado em embriões de sementes de araucária dessecadas 120 horas em sílica gel, imersas 144 horas em glicose (60%) + glicerol (15%) e criopreservadas em nitrogênio líquido.



Resultados do teste de tetrazólio A – sementes dessecadas 120 horas em sílica gel; B - sementes imersas 144 horas em glicose (60%) + glicerol (15%); C - Sementes criopreservadas em nitrogênio líquido; D – embrião inviável de semente criopreservada observado em estereoscópio.

**Foto:** Tiago Scolari (2016).

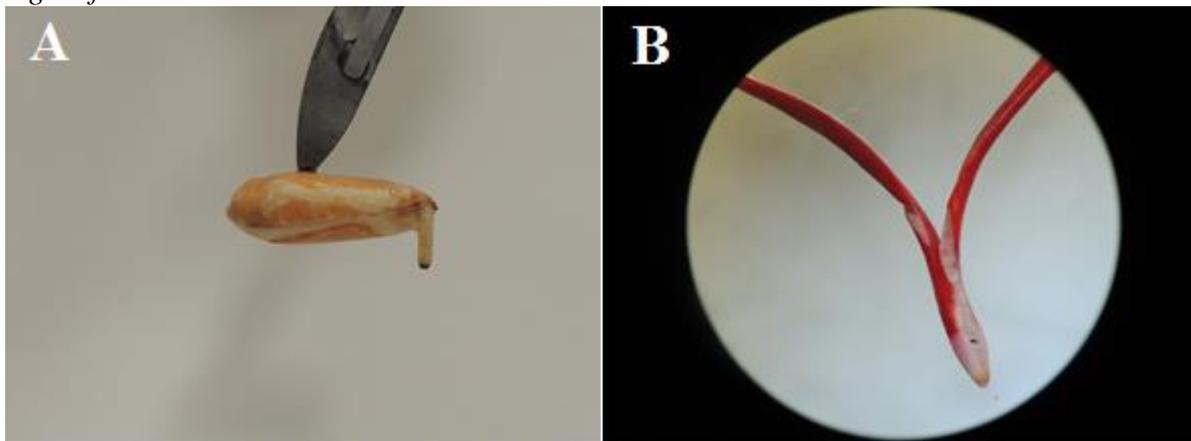
Verifica-se no gráfico 4 a mesma tendência observada no gráfico 3, em que os embriões reduzem a viabilidade com a dessecação. A dessecação em sílica gel por 120 horas

reduziu o grau de umidade em 3,66%. Embora a perda de umidade tenha sido relativamente baixa a viabilidade das sementes foi reduzida em 12%.

Outro fator que pode ter contribuído para a perda da viabilidade dos embriões das sementes foi o ataque de larvas de *Cydia araucariaceae*. Santos (2014) também teve problemas com essa lagarta, que é uma das principais pragas que atacam as sementes de *A. angustifolia*. Carvalho (2002) explica que esse inseto causa dano abrindo galerias em sementes, botões apicais e ramos. Nas sementes os danos levam a sua inviabilidade, pois as galerias alcançam o embrião, prejudicando-o irreversivelmente. Estes danos também tornam a semente imprópria para a alimentação humana.

Na imagem 11-A pode-se observar uma larva de *Cydia araucariaceae* que estava se alimentando de uma semente de *A. angustifolia*. Também pode-se observar na imagem 11-B o dano causado pela lagarta no embrião de uma semente de araucária, que apresentou inviabilidade quando colorido no teste de tetrazólio.

**Imagem 11.** Danos causados por *Cydia araucariaceae* em semente e embrião de *Araucaria angustifolia*.



A – Larva de *Cydia araucariaceae* em galeria aberta em semente de araucária; B – Dano de *Cydia araucariaceae* em embrião colorido pelo teste de tetrazólio.

**Foto:** Tiago Scolari (2016).

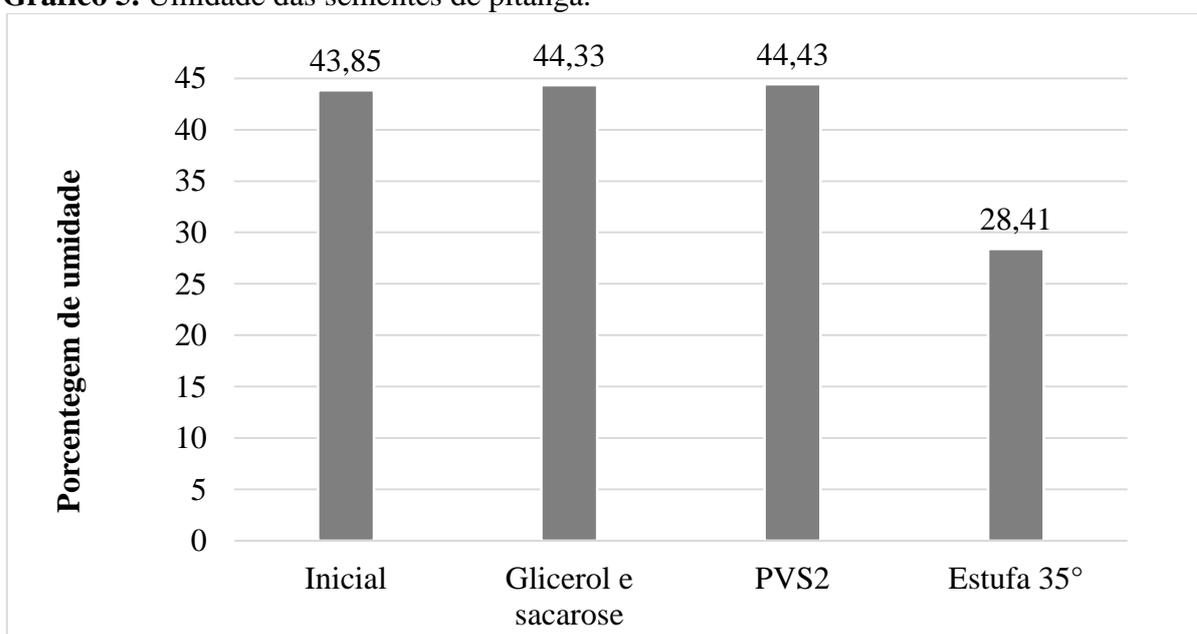
Depois de imersas 72 horas em glicose (60%) + glicerol (15%) a umidade foi reduzida a 40,41% e a viabilidade dos embriões passou a 68%. Quando as sementes foram imersas por 144 horas na solução de glicose 60% + glicerol 15% a umidade foi reduzida a 36,1%; abaixo da umidade crítica de 39% para sementes sem tegumento descrita por Eira (1994) e 37% com tegumento descrita por Tompsett (1984), porém os embriões ainda apresentavam 60% de viabilidade. Comparando com a umidade crítica para araucária, de 36%, verificada por Bianchetti e Ramos (1981) as sementes ainda estariam com um teor de umidade seguro para a manutenção da viabilidade.

#### 4.4 EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO EM SEMENTES DE PITANGA

No gráfico 5 está apresentada a umidade das sementes após cada tratamento com soluções crioprotetoras e após a secagem em estufa. A umidade inicial das sementes de pitanga foi de 43,85%, depois de imersas por uma hora em solução de glicerol e sacarose a umidade passou para 44,33%, após imersas por 6 horas em solução PVS2 aumentou para 44,43%. Quando as sementes foram secas em estufa a 35°C por 144 horas a umidade decaiu para 28,41%.

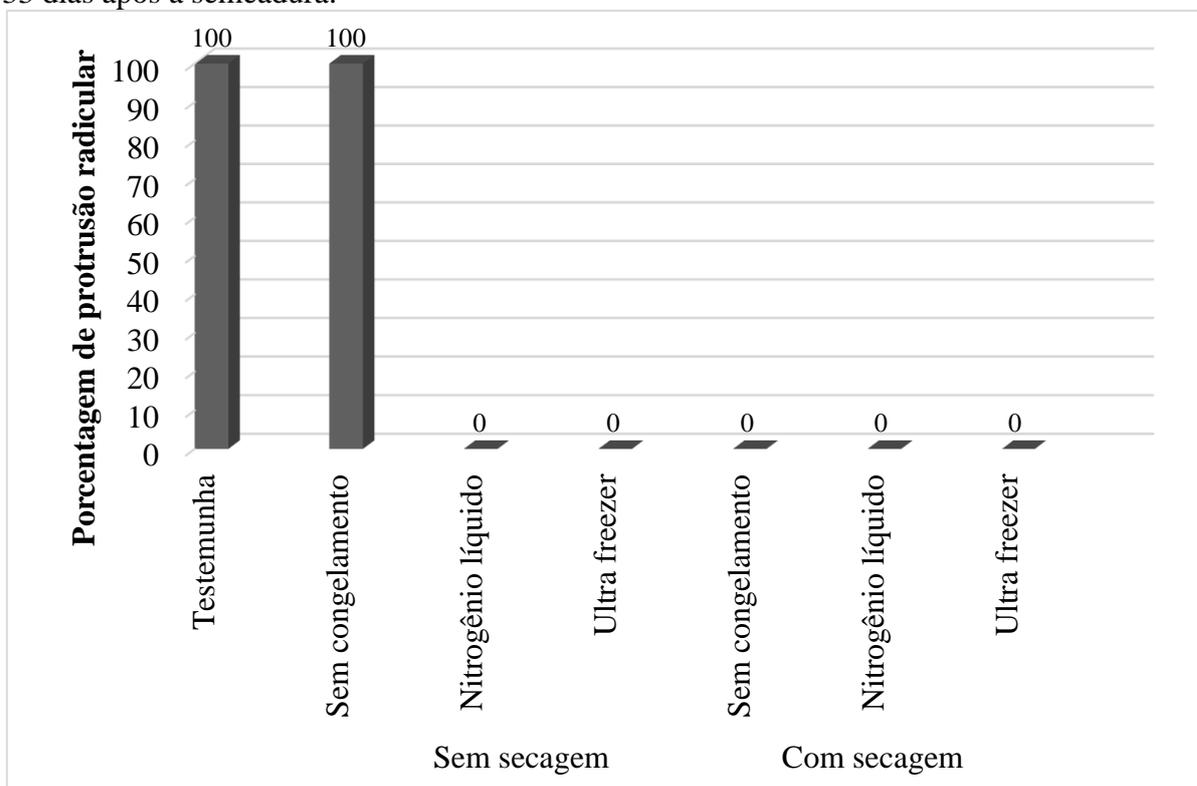
O esperado era uma redução no grau de umidade das sementes em função do reduzido potencial osmótico da solução, entretanto, isto não foi observado. Uma explicação para o ocorrido é que alguns componentes do PVS2 penetraram nas sementes em função da permeabilidade das membranas aos mesmos e com isto aumentou o peso seco das sementes. Segundo Castro et al., (2011), o etilenoglicol, o dimetilsulfóxido e o glicerol apresentam alta capacidade de penetração nas células. Estes crioprotetores denominados de penetrantes atuam tanto interna quanto externamente na célula (SILVA; GUERRA, 2011). Externamente agem desidratando a célula devido ao efluxo de água intracelular para equilibrar o meio extracelular e internamente estes compostos ligam-se aos fosfolípídeos das membranas celulares, reduzindo a fluidez da membrana e interagindo com ligações proteicas e glicoproteicas da membrana (PARKS; GRAHAM, 1992). Os crioprotetores penetrantes podem ainda permanecer no citoplasma das células, reduzindo o potencial osmótico das mesmas e, conseqüentemente, o ponto de congelamento (THIRUMALA et al., 2006).

**Gráfico 5.** Umidade das sementes de pitanga.



Nos testes de protrusão radicular e germinação de sementes de pitanga criopreservadas não foi possível realizar a análise de variância e comparação de médias com os dados obtidos, então a análise desses dados procedeu-se por meio de estatística descritiva.

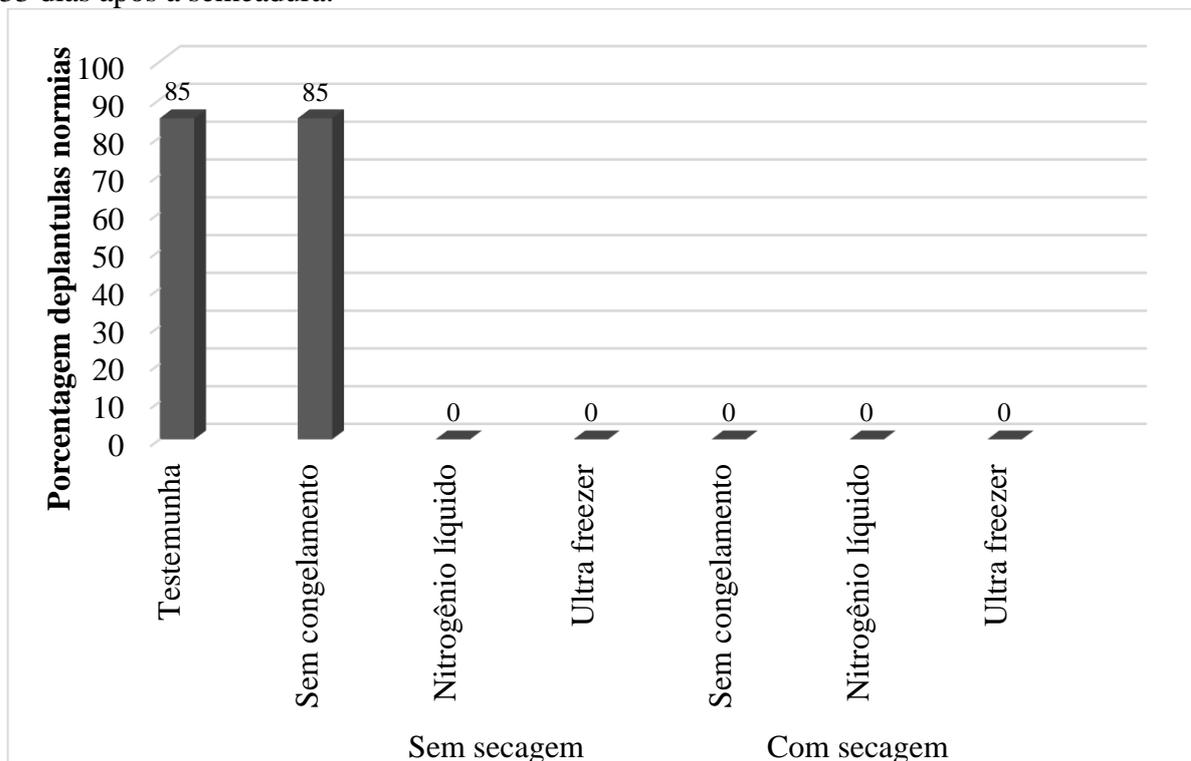
**Gráfico 6.** Porcentagem média de protrusão radicular de sementes de pitanga criopreservadas 33 dias após a semeadura.



No Gráfico 6 é possível verificar que houve protrusão radicular somente na testemunha e no tratamento que não recebeu secagem e nem congelamento. Ambos apresentaram 100% das sementes com protrusão radicular. Esse resultado demonstra que a crioproteção com solução de PVS2, que possui um baixo potencial hídrico, não causou efeitos negativos sobre a protrusão radicular, já que tanto testemunha quanto as sementes sem secagem e sem congelamento apresentaram a mesma porcentagem.

Lamarca e Barbedo (2014) observaram o mesmo resultado para emissão de radícula primária de sementes de pitanga sem secagem, as quais apresentavam 59,62% de umidade. Nos demais tratamentos não houve protrusão radicular. Isso indica que tanto a secagem quanto o congelamento foram agressivos o suficiente para matar as sementes.

**Gráfico 7.** Porcentagem média de plântulas normais de sementes de pitanga criopreservadas 33 dias após a semeadura.



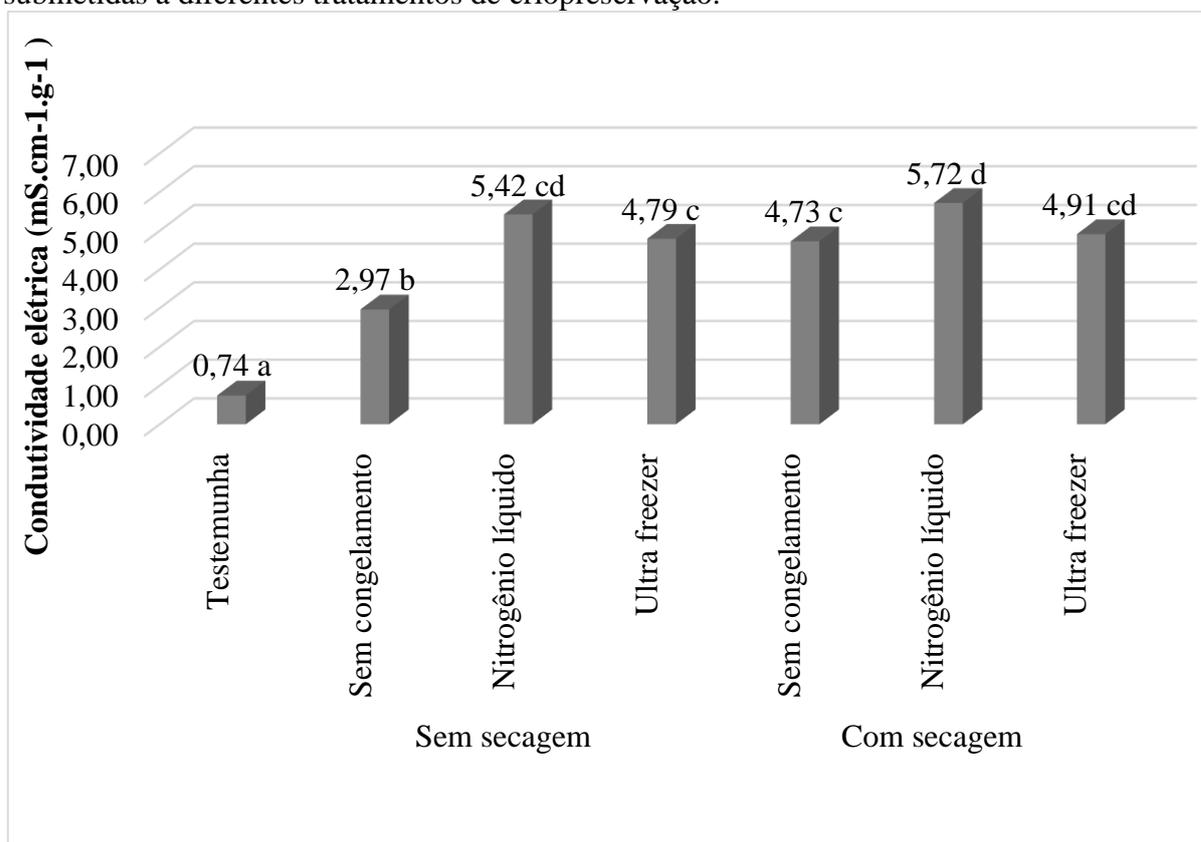
No gráfico 7 verifica-se uma situação semelhante àquela observada no Gráfico 6 onde apenas a testemunha e o tratamento que não recebeu secagem e nem congelamento formaram plântulas normais. Ambos os tratamentos apresentaram médias de 85% de plântulas normais. Wielewicki et al. (2006) avaliaram a germinação de 44 lotes de sementes de pitanga e observaram média de 86% de germinação. Portanto, a porcentagem de germinação dessas sementes está de acordo com o encontrado na literatura. O uso do crioprotetor PVS2 não causou efeito negativo sobre a formação de plântulas normais, pois novamente o tratamento sem secagem e sem congelamento se equiparou a testemunha. Por outro lado, tanto o congelamento rápido quanto o lento foram letais as sementes, provavelmente, pela formação de cristais de gelo e conseqüentemente rompimento das células.

Além disso, os dados evidenciam que não somente o congelamento, mas a secagem foram prejudiciais a qualidade fisiológica das sementes, pois com umidade de 28,41% não houve germinação nem protrusão radicular. Delgado (2006) verificou que conforme as sementes de pitanga eram secas a porcentagem de germinação diminuía, apenas 7% de germinação foi obtido pelo autor quando as sementes foram secas em estufa até a umidade de 26,4%.

Pelos resultados do teste de condutividade elétrica, gráfico 8, nota-se que a testemunha liberou menor quantidade de lixiviados na solução de embebição das sementes, 0,74 mS.cm<sup>-1</sup>

$^{1.g^{-1}}$ , do que os demais tratamentos. As sementes de pitanga que não receberam secagem e nem congelamento apresentaram condutividade elétrica de  $2,97 \text{ mS.cm}^{-1}.g^{-1}$ , um valor 4 vezes maior do que o observado pela testemunha, havendo diferença estatística significativa entre esses tratamentos. Estes resultados sugerem que os tratamentos de vitrificação reduzem o vigor das sementes, embora não tenha contribuído para a redução da porcentagem de germinação. Os testes de vigor são mais sensíveis para detectar diferenças na qualidade fisiológica das sementes do que o de germinação, sendo que o de condutividade elétrica é considerado um dos mais sensíveis por avaliar distúrbios nas membranas. Segundo Delouche e Baskin (1973), a degeneração das membranas é o primeiro evento deteriorativo a partir da maturidade fisiológica das sementes.

**Gráfico 8.** Condutividade elétrica média de sementes de pitanga com e sem secagem submetidas a diferentes tratamentos de criopreservação.



Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Outra explicação para o aumento da condutividade elétrica na solução de embebição quando as sementes foram tratadas com crioprotetores é que as soluções osmóticas, ricas em açúcares e álcoois, podem ter contribuído para o aumento do valor da leitura. Outra possibilidade, é que essas soluções, altamente concentradas, podem ter penetrado na semente tornando seu interior altamente concentrado. Quando as sementes foram colocadas em água

para realização do teste de condutividade elétrica, esses solutos foram lixiviados do mesmo modo em que foram absorvidos em função do potencial osmótico, contribuindo para o aumento do valor de condutividade elétrica.

Quando se analisa a secagem, nota-se que esta afetou negativamente as sementes sem congelamento, conduzindo a maior lixiviação de solutos na solução de embebição e causando diferença significativa entre os tratamentos não congelados.

Os tratamentos nitrogênio líquido e ultra freezer, não diferiram entre si, independentemente da secagem. No entanto, é possível observar que todas as médias dos tratamentos que receberam secagem foram maiores que os seus similares sem secagem. Isso reforça a ideia de que a secagem pode ter causado algum efeito sobre as membranas celulares levando a maior lixiviação de solutos.

A maior lixiviação de solutos de sementes secas em relação as mais hidratadas é natural, visto que as primeiras apresentam as membranas celulares mais desorganizadas e, portanto, mais permeável a saída de solutos. Ao realizarem o teste de condutividade elétrica em sementes de pitanga com diferentes níveis de secagem, Lamarca e Barbedo (2014) observaram valores de condutividade elétrica superiores aos obtidos nesse trabalho. Respectivamente os valores que observaram foram  $4.58 \text{ mS.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$  e  $20.84 \text{ mS.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$  para as sementes com o teor de água inicial (59,62%) e sementes secas severamente (37,45%). Portanto ocorreu a mesma tendência das sementes que receberam secagem mais intensa apresentarem maior lixiviação de solutos.

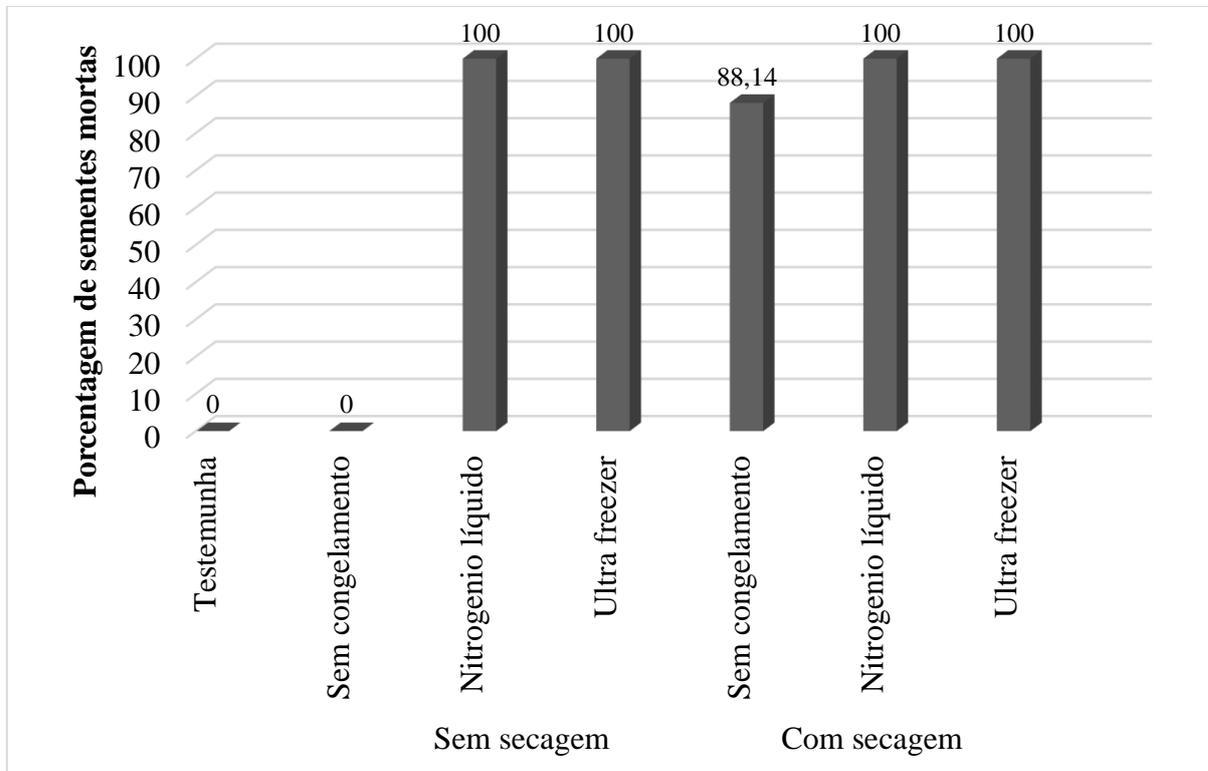
Ainda pelo gráfico 8 é possível observar que os tratamentos que foram congelados em nitrogênio líquido não se diferenciaram entre si, mas independentemente da secagem, ambos se diferenciaram do sem secagem e sem congelamento, além de apresentarem médias maiores que todos os demais tratamentos. Isso evidencia que pode ter ocorrido a formação de cristais de gelo no interior das células levando ao rompimento das membranas e causando maior lixiviação de solutos nos tratamentos com nitrogênio líquido do que nos demais.

O tratamento de congelamento em ultrafreezer sem secagem com média de  $4,79 \text{ mS.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$  diferiu significativamente do sem congelamento e sem secagem,  $2,97 \text{ mS.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$ . Porém quando as sementes foram secas não houve diferença entre congelamento em ultrafreezer e sem congelamento. Independente da secagem as sementes não congeladas apresentaram menor média de condutividade elétrica que as congeladas em ultrafreezer.

Ao observar os resultados do teste de tetrazólio expressos no gráfico 9 constatou-se que, exceto para o tratamento com secagem e sem congelamento, as sementes dos tratamentos que não haviam apresentado protrusão radicular e formação de plântulas normais estavam de

fato todas não viáveis, pois foram classificadas na categoria F da escala de interpretação do teste de tetrazólio para pitanga proposta por Kaiser et al. (2014).

**Gráfico 9.** Porcentagem média de sementes de pitanga não viáveis verificadas no teste de tetrazólio.

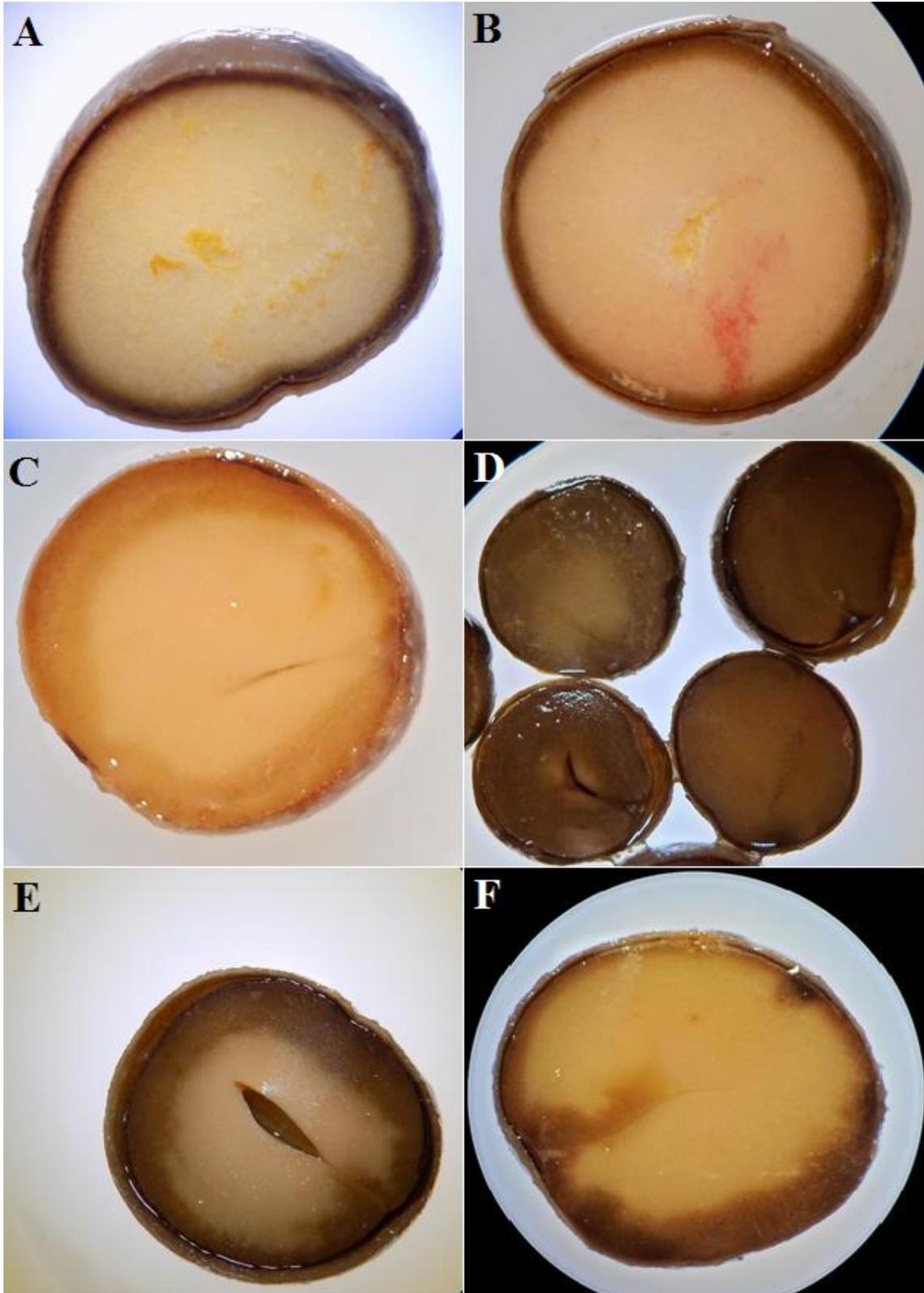


O tratamento com secagem e sem congelamento apresentou 88,14% de sementes não viáveis, evidenciando que a secagem foi demasiada e que mesmo crioprotegidas as sementes não puderam ser secas a teores de água abaixo do considerado letal para a espécie.

Na imagem 12 estão dispostos os resultados do teste de tetrazólio. A imagem 12-B refere-se ao tratamento sem secagem congelado em nitrogênio líquido, o qual apresentou 100% de sementes não viáveis. No entanto, verificou-se nesse tratamento, uma única semente, observada na imagem 12-B, com uma pequena mancha de coloração rósea, indicando que naquela região colorida a semente estava respirando. Tal resultado sugere que talvez com alguns ajustes metodológicos esse tratamento possa permitir a criopreservação de sementes de pitanga.

Visualmente ainda observa-se que os tratamentos que receberam secagem (imagens 12- D, 12-E e 12-F) estavam com coloração mais escurecida que os tratamentos sem secagem, indicando que as sementes secadas possam ter sido torradas na secagem.

**Imagem 12.** Resultados do teste de tetrazólio realizado em sementes de pitanga submetidas a diferentes tratamentos.



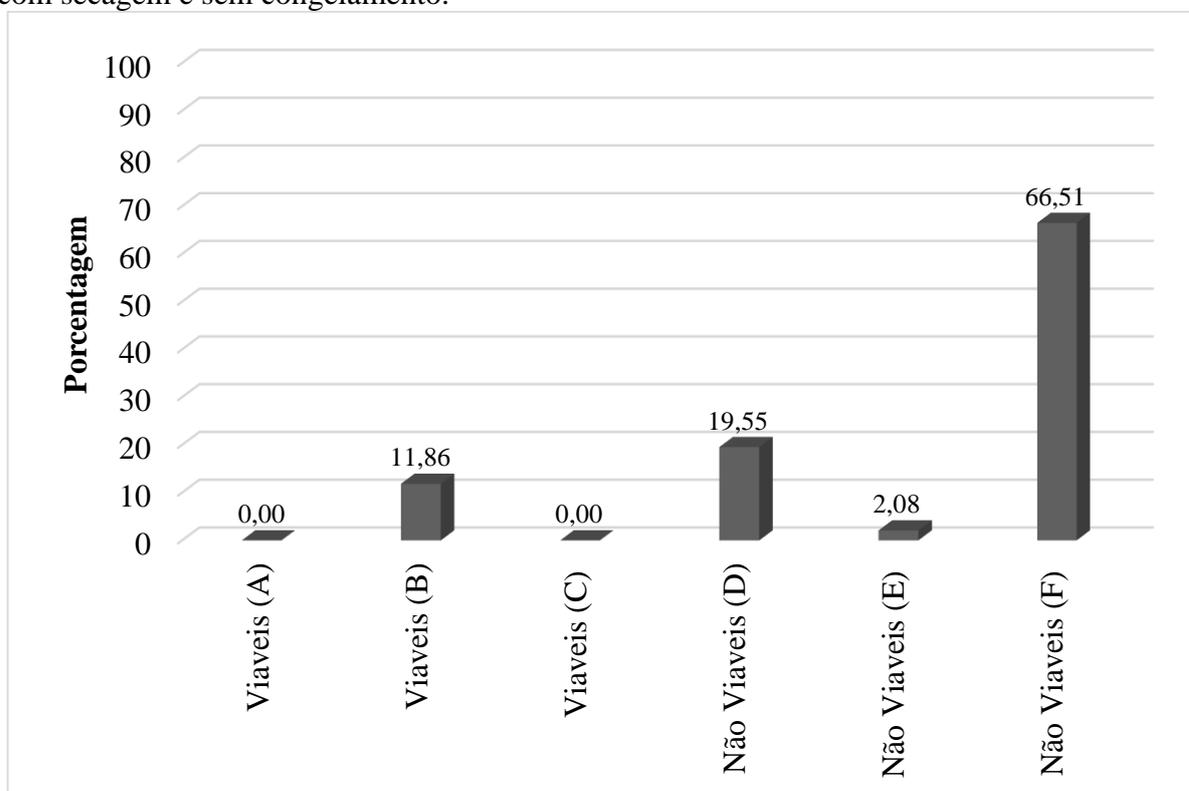
Resultado do teste de tetrazólio: A e B – Sem secagem e congelado em nitrogênio líquido; C – Sem secagem e congelado em ultra freezer; D – Com secagem e sem congelamento; E - Com secagem e congelado em nitrogênio líquido; F - Com secagem e congelado em ultra freezer;

**Fotos:** Andre da Silva Lefchak; Lisandro Tomas da Silva Bonome (2016).

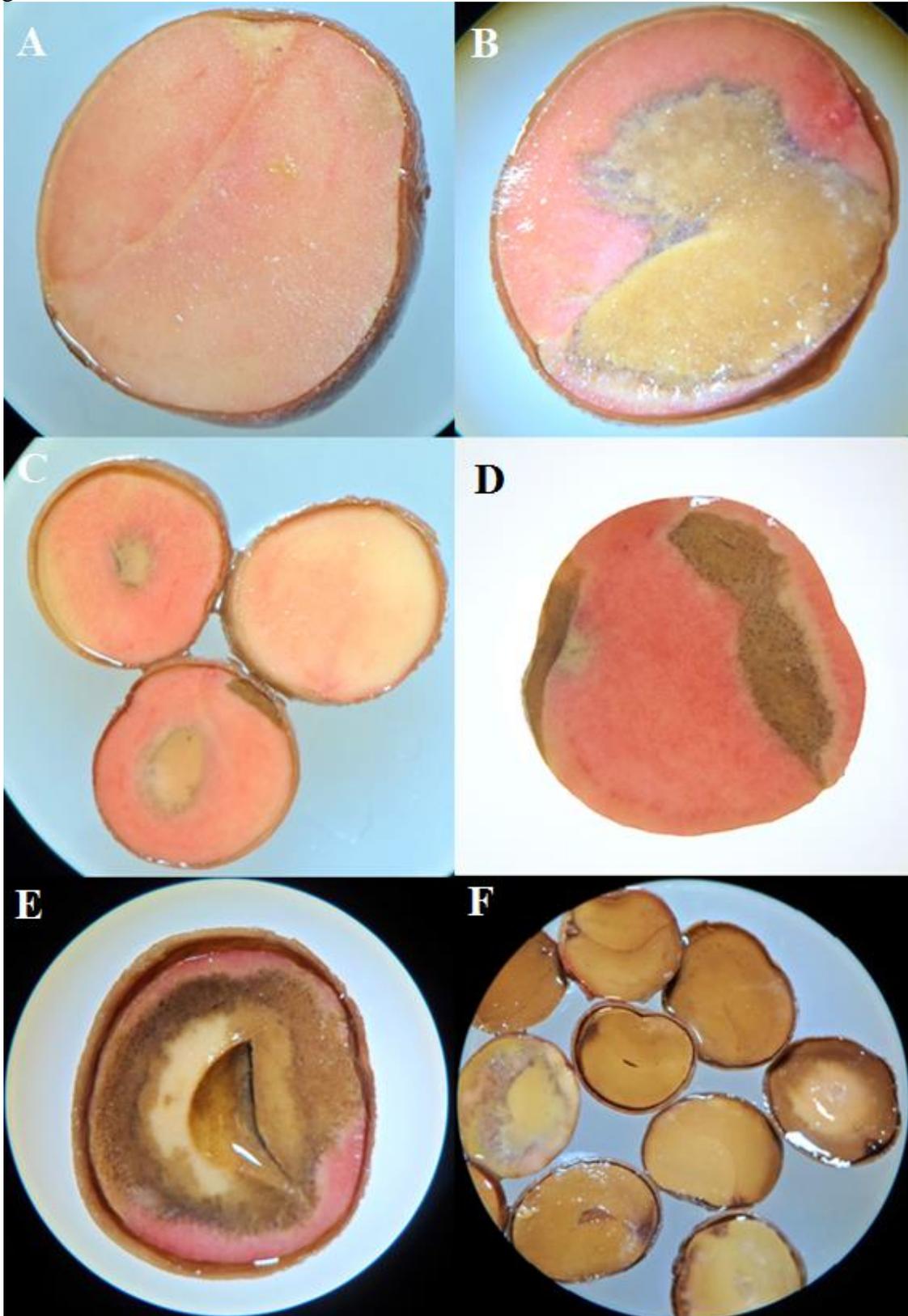
O gráfico 10 mostra a classificação de acordo com a escala de viabilidade de sementes de *Eugenia uniflora* para o teste de tetrazólio proposta por Kaiser et al. (2014) para as sementes do tratamento que recebeu secagem e não foi congelado. Observa-se que 11,86% das sementes ainda estavam viáveis classificadas na categoria B. Santana (2007) discorre que a condição ambiental sob a qual as sementes se desenvolvem podem resultar em transformações bioquímicas, causando diferentes comportamentos fisiológicos das sementes, como uma maior tolerância a dessecação. O tratamento que foi seco e não congelado apresentou umidade de 28,41%, valor 4,1% menor que a umidade letal de 32,5% (Delgado, 2006). Sugere-se que tal resultado pode ter sido obtido em função da condição ambiental em que essas sementes se formaram, o que lhes conferiu uma maior tolerância a dessecação.

Das sementes restantes do tratamento que recebeu secagem e não foi congelado 19,55% não estavam viáveis contemplando a categoria D, 2,08% não estavam viáveis contemplando a categoria E e 66,51% foram classificadas na categoria F. Na imagem 13 pode-se observar melhor o resultado do teste de tetrazólio do tratamento que recebeu secagem e não foi congelado.

**Gráfico 10.** Resposta ao teste de tetrazólio das sementes de pitanga submetidas ao tratamento com secagem e sem congelamento.



**Imagem 13.** Resultado do teste de tetrazólio realizado no tratamento com secagem e sem congelamento.



Resultado do teste de tetrazólio conforme escala de Kaiser et al., (2014): A - sementes classificadas na categoria b; B, C, D e E – Sementes classificadas na categoria d; F – sementes de pitanga inviáveis (categoria f).

**Fotos:** Andre da Silva Lefchak (2016).

## 5 CONCLUSÕES

Os crioprotetores apresentaram efeitos distintos sobre a qualidade fisiológica das sementes, variando em função da espécie, tipo de crioprotetor, concentração utilizada e tempo em contato com a semente.

A criopreservação foi prejudicial a qualidade fisiológica das sementes de *Araucaria angustifolia* e de *Eugenia uniflora*, causando perda da viabilidade.

Os crioprotetores nas concentrações avaliadas no bioensaio 1 (sacarose a 0,5; 1 e 1,5 Mol.L<sup>-1</sup>, dextrose a 2 Mol.L<sup>-1</sup> e glicerol a 10; 20; 30 e 40% (v/v)) não causaram prejuízos sobre a qualidade fisiológica de sementes de *A. angustifolia*.

A solução PVS2 foi eficiente em reduzir o grau de umidade de sementes de *A. angustifolia*. No entanto, a imersão por 48 horas afetou significativamente a viabilidade das sementes.

O uso de sílica gel por 120 horas para dessecação e imersão em glicose (60%) + glicerol (15%) por 72 e 144 também permitiu a redução da umidade de sementes de *A. angustifolia*. No entanto, similar ao observado para a solução PVS2, conforme a umidade foi reduzida houve diminuição significativa na viabilidade das sementes.

O pré tratamento de sementes de *E. uniflora* com glicerol + sacarose e PVS2 não reduziu o grau de umidade das sementes e também não causou prejuízos sobre a germinação.

O pré tratamento de sementes de *E. uniflora* com glicerol + sacarose e PVS2 não reduziu o vigor das sementes medido pelo teste de condutividade elétrica.

A criopreservação por congelamento rápido não foi eficiente para manutenção da qualidade fisiológica de sementes de *A. angustifolia* e *E. uniflora*, causando alta mortalidade nas sementes das duas espécies.

A criopreservação por congelamento lento não foi eficiente para manutenção da qualidade fisiológica de sementes de *E. uniflora*, causando alta perda de viabilidade das sementes.

## REFERÊNCIAS

- AVILA, A. L. et al. Maturação fisiológica e coleta de sementes de *Eugenia uniflora* L. (pitanga), Santa Maria, RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 19, n. 1, p. 61-68, jan.-mar., 2009.
- 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.
- BEZERRA, J. E. F. et al. Propagação de genótipos de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) pelo método de enxertia de garfagem no topo em fenda cheia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 160-162, abr. 2002.
- BIANCHETTI, A.; RAMOS, A. Efeito da temperatura de secagem sobre o poder germinativo de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Curitiba, n. 2, p. 27- 56, jun. 1981.
- BRASIL. **Manual técnico da vegetação brasileira**: Sistemas fitogeográficos inventário das formações florestais e campestres técnicas e manejo de coleções botânicas procedimentos para mapeamentos. 2ª Ed. IBGE, 2012.
- 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. 2015.
- BONOME, L. T. S. et al. **Alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares em sementes de seringueira** [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Adr. de Juss.) Müell.-Arg.] **durante o armazenamento**. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
- 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.
- BROWN, A. H. D; HARDNER, C.M. Sampling the gene pools of Forest trees for ex situ conservation. In: YOUNG, A.; BOSCHER, D.; BOYLE, T. (Ed.). *Forest conservation genetics: principles and practice*. Collingwood: CSIRO Publishing, 2000. p.185-196.
- CARRILLO, V.P; CHAVES, A; FASSOLA, H. 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, M. M. X. **O desmatamento das florestas de araucária e o Médio Vale do Iguaçu: uma história de riqueza madeireira e colonizações**. Dissertação (Mestrado em História). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006. a.

- CARVALHO, P. E. R. **Pinheiro-do-Paraná**. Colombo: EMBRAPA Florestas, 2002.
- CARVALHO, V. S. **Criopreservação de sementes e pólen de orquídeas**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006. b.
- CARVALHO, V. S.; OTONI, W. C. Criopreservação de Germoplasma Vegetal. In: PEREIRA, T. N. S. (Ed). **Germoplasma: conservação, manejo e uso no melhoramento de plantas**. Viçosa: Arca, p.89-113. 2010.
- CASTRO, S. V. et al. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, 2011.
- CICERO, S.M.; MARCOS FILHO, J.; TOLEDO, F.F. Efeitos do tratamento fungicida e de três ambientes de armazenamento sobre a conservação de seringueira. **Anais da ESALQ**, Piracicaba, v.43, n.2, p.763-787, 1986
- COELHO, R. R. P. **Protocolo de criopreservação 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.
- CAVALCANTI MATA, M. E. R. M.; BRAGA, M.E.D.; SILVA, M. Curvas de congelamento de frutos de cajá (*Spondias lutea* L.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, Especial, n. 1, p. 55-62, 2003.
- CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CHAPMAN, D. 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.
- DELGADO, L. F. **Tolerância à dessecação em sementes de espécies brasileiras de *Eugenia***. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.
- DELGADO, L. F.; BARBEDO, C. J. Tolerância à dessecação em sementes de espécies de *Eugenia*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.2, p. 265-272, 2007.
- DELOUCHE, J. C., BASKIN, C. C. Accelerated ageing techniques for predicting the relative storability of seed lots. **Seed Science & Technology**, Wageningen, v. 51, p. 427-452, 1973.
- 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.
- 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.

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

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. 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.

HONG, T.D.; ELLIS, R.H. **A protocol to determine seed storage behavior.** In: ENGELS, J.M.M; TOLL, J. Rome: IPGRI, 1996. 62p.

KAISER, D. K. et al. Adjustment of the methodology of the tetrazolium test for estimating viability of *Eugenia uniflora* L. seeds during storage. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 3, p. 344-351, 2014.

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.

LAMARCA, E. V.; BARBEDO, C. J. Methodology of the tetrazolium test for assessing the viability of seeds of *Eugenia brasiliensis* Lam., *Eugenia uniflora* L. and *Eugenia pyriformis* Cambess. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 4, p. 427-434, 2014.

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.

MOLINA, T. F. et al. Crioconservação em sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 28, n 3, p.72-81, 2006.

MORITZ, B.; TRAMONTE, V. L. C. Biodisponibilidade do licopeno. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 265-273, mar.-abr. 2006

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.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.

PORTO, J. M. P. **Criopreservação de calos, ápices caulinares e sementes de barbatimão**. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

RANZANI, R. E. **Influência do teor de água na qualidade fisiológica e criopreservação de sementes de *Passiflora suberosa* L.** Monografia (Graduação em agronomia). Cáceres: UNEMAT, 2015.

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.

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.

SANTANA, P. J. A. **Maturação, secagem e armazenamento de sementes de espécies de *Eugenia* (Myrtaceae)**. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente). São Paulo: Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, 2007.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal: A alternativa para conservação a longo prazo. **Biociência**, 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, T. T. A. **conservação de sementes de citrumelo “Swingle” colhidas em diferentes estádios de maturação e submetidas a tratamentos fungicidas**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 370-384, 2011.

- 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.
- THIRUMALA, S. et al. Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. **Theriogenology**, v. 66, p. 964-973, 2006.
- TOMBLATO, 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**, Webesbourne, v. 105, n. 3, p. 581-586, 1984.
- VERTUCCI, C. W. et al. Cryopreservation of embryonic axes of an homeohydrous (recalcitrant) seed in relation to calorimetric properties of tissue water. **CryoLetters** 12: 339–350, 1991.
- VENDRAMIN, D. W.; CARVALHO, R I. N. Qualidade fisiológica de sementes de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) (Myrtaceae). **Estudos de Biologia**, v. 35, n. 84, p. 59-65, 2013.
- WALTERS, et al. Cryopreservation of Recalcitrant (i.e. Desiccation-Sensitive) Seeds. In: REEDS, B. M. **Plant cryopreservation: a practical guide.** New York: Springer, 2008.
- WIELEWICKI, A.P. et al. Padrões de germinação e do teor de água para sementes florestais. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 28, n. 3, p.191-197, 2006.