

CAROLINE FRIZZO

COMPORTAMENTO DE EIXOS EMBRIONÁRIOS DE
Araucaria angustifolia BERTOL (O. KUNTZE) APÓS A CRIOPRESERVAÇÃO,
USANDO O MÉTODO DE ENCAPSULAMENTO-DESIDRATAÇÃO

CURITIBA

2013

CAROLINE FRIZZO

COMPORTAMENTO DE EIXOS EMBRIONÁRIOS DE
Araucaria angustifolia BERTOL (O. KUNTZE) APÓS A CRIOPRESERVAÇÃO,
USANDO O MÉTODO DE ENCAPSULAMENTO-DESIDRATAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marguerite G.G. Quoirin

Coorientadora: Dr^a. Elisa Serra Negra Vieira

CURITIBA

2013

F921 Frizzo, Caroline

Comportamento de eixos embrionários de Araucária
Angustifolia Bertol (O. Kuntze) após a criopreservação, usando
o método de encapsulamento-desidratação. / Caroline Frizzo. –
Curitiba : 2014
65 f. il.

Orientadora: Marguerite G. G. Quoirin
Co-orientadora: Elisa Serra Negra Vieira
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em
Agronomia – Produção Vegetal.

1. Sementes - Conservação. 2. Pinheiro-do-Paraná. I. Quoirin,
Marguerite G. G. II. Vieira, Elisa Serra Negra. III. Universidade
Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Agronomia - Produção Vegetal. IV. Título

CDU 631.53.027.32:582.473



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL



PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pela candidata **CAROLINE FRIZZO**, sob o título "**COMPORTAMENTO DE EIXOS EMBRIONÁRIOS DE *Araucaria angustifolia* Bertol (O. KUNTZE) APÓS CRIOPRESERVAÇÃO, USANDO O MÉTODO DE ENCAPSULAMENTO-DESIDRATAÇÃO**", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

Curitiba, 31 de Outubro de 2013.

Professora Dra. Louise Larissa May De Mio
Coordenadora do Programa

Dra. Izulme Rita Imaculada Santos
Primeira Examinadora

Professor Dr. Flavio Zanette
Segundo Examinador

Professora Dra. Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin
Presidente da Banca e Orientadora

Aos meus pais Maurivan, Gissella e minha irmã Camila

Por toda a dedicação, amor e carinho.

Ofereço

*A minha madrinha Maristela Cordasso (in
memorian), a carinhosa Téia pelo exemplo
de dedicação, trabalho e amor ao próximo.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná (UFPR), ao curso de Pós-graduação em Agronomia- Produção Vegetal e a Embrapa Florestas por todo o apoio na condução deste trabalho e a CAPES pela concessão da bolsa.

Professora Marguerite Quoirin, obrigada por ter aceitado me orientar contribuindo com minha formação e compartilhando seu conhecimento e um grande exemplo a ser seguido.

Elisa Serra Negra Vieira que além de ser minha co-orientadora se tornou minha amiga e uma das pessoas que mais admiro e que me espelho.

Meus pais Maurivan L. Frizzo e Gissella M. Cordasso Frizzo e minha irmã Camila Frizzo por ser a minha família e a minha base.

Minhas amigas Lucivani Zatta e Vanessa Cassol amigas de longa data e irmãs que eu pude escolher.

Cassiane Stella Teixeira, Aline Bortoncello, Samara Pozzan, Ediana Rossi, Renata Grunennvaldt e Marli J. Santos, obrigada.

Vanessa Reinhart e Cassiana Oliveira, pessoas mais que especiais que me ajudaram em todo o percurso desta fase e tenho certeza que nas próximas também, muito obrigada por tudo.

Paulo Bueno, Felipe Francisco, Lais G. Adamuchio, Fernanda Pinto, Yohana de Oliveira, Clarissa Mudry, Valeria Lopes e Eduardo Carneiro colegas de laboratório que contribuíram muito.

A Lucimara Antunes secretária do curso de Pós-graduação em Agronomia Produção Vegetal por toda a atenção dedicada nesse período.

A equipe do Laboratório de Sementes da Embrapa Florestas Adilson Tomaschitz, Gizelda Rego, Roberto Carletto, Rueidi Bastos, Natalia R. Saloio e Jeniffer Grabiaspor toda a ajuda.

A Juliana Degenhardt-Goldbach, Janaina Campos, Mariane Bernardes e Daiane Rigoni Kestring por terem cedido o laboratório de micropropagação e transformação de plantas e o de Genética da Embrapa Florestas. A Izulmé R. I. Santos, Rosangela C. Mundim e Antonieta Salomão da Embrapa Cernargen por todo conhecimento compartilhado.

Professora Dra. Maristela Panobianco, Professor Dr. Flávio Zanette e os demais membros da banca de pré-defesa e defesa pelas valiosas contribuições para a finalização deste documento.

Deus e meu anjo da guarda, obrigada por sempre estarem guiando meus passos.

E a todos que de alguma forma com o seu jeito contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada por tudo, serei eternamente grata a cada um.

*"Nós nunca descobriremos o que vem depois da escolha,
se não tomarmos uma decisão. Por isso, entenda os seus medos,
mas jamais deixe que eles sufoquem os seus sonhos."*

— Alice no País das Maravilhas

COMPORTAMENTO DE EIXOS EMBRIONÁRIOS DE
Araucaria angustifolia **BERTOL (O. KUNTZE) APÓS A CRIOPRESERVAÇÃO,**
USANDO O MÉTODO DE ENCAPSULAMENTO-DESIDRATAÇÃO

RESUMO

Araucaria angustifolia Bertol Kuntze é uma das espécies nativas de maior importância econômica e ecológica para a região sul do Brasil. A natureza recalcitrante da espécie dificulta a conservação em longo prazo de suas sementes, sendo a criopreservação a forma de conservação mais apropriada. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o comportamento de eixos embrionários de araucária mediante aplicação da metodologia de criopreservação por encapsulamento e desidratação. Para tanto, eixos embrionários excisados das sementes foram encapsulados e desidratados, sendo submetidos a dois métodos de criopreservação: o congelamento rápido e o pré-resfriamento a -40°C seguido do congelamento em nitrogênio líquido. Os eixos embrionários foram criopreservados por duas horas e, em seguida, foram descongelados rapidamente, cultivados *in vitro* e foram realizadas as análises da integridade do DNA, germinação *in vitro*, oxidação e o teste de tetrazólio. Foram avaliados o número de eixos embrionários germinados, a formação de calos e o aspecto oxidado. Após a criopreservação, não ocorreu a degradação do DNA dos eixos criopreservados e, pelo teste de tetrazólio, a maioria dos eixos embrionários que foram criopreservados pelo método de congelamento rápido apresentou o mesmo aspecto dos eixos embrionários não criopreservados, enquanto os eixos submetidos ao congelamento moderado tinham coloração vermelha mais escura quando comparados com os demais. Todos os eixos apresentaram aspecto de oxidação, porém 68,57% dos que foram congelados rapidamente tiveram oxidação, enquanto que a percentagem dos pré-resfriados oxidados foi de 10,80%, com aspecto de total deterioração. Não houve germinação *in vitro* dos eixos embrionários criopreservados. O método de encapsulamento e desidratação é promissor para criopreservação de eixos embrionários de araucária e se faz necessária a continuação dos estudos para a definição de um método de criopreservação dos eixos embrionários que permita sua germinação posterior.

Palavras-chave: araucária; encapsulamento; congelamento; recalcitrância;

BEHAVIOR OF EMBRYONIC AXES OF *Araucaria angustifolia* BERTOL (O. KUNTZE) AFTER CRYOPRESERVATION, USING THE METHOD OF ENCAPSULATION-DEHYDRATION

ABSTRACT

Araucaria angustifolia Bertol Kuntze is one of the native species of greatest economic and ecological importance to the southern region of Brazil. The recalcitrant nature of the species hampers the long-term conservation of its seeds, being the cryopreservation the most appropriate conservation method. The purpose of this study was to evaluate the behavior of embryonic axes of *Araucaria* upon application of cryopreservation methods for encapsulation and dehydration. Embryonic axes, excised from seeds, were encapsulated and dehydrated, being subjected to two methods of cryopreservation: fast freezing and pre-cooling at -40°C followed by freezing in liquid nitrogen. The embryonic axes were cryopreserved for two hours and then were thawed rapidly, grown in vitro and analyses of DNA integrity, in vitro germination, oxidation and the tetrazolium test were carried out. The number of germinated axes, the embryonic callus formation and the oxidized aspect of axes were evaluated. After cryopreservation, DNA degradation of axes did not occur. The tetrazolium test showed that most of the embryonic axes that had been cryogenically preserved by quick-freezing method presented the same aspect as the cryopreserved axes, while those subjected to moderate freezing presented a darker red colour when compared with others. All axes presented aspect of oxidation, but those that were quickly frozen had a higher percentage of oxidation (68.57%) while the pre-chilled presented 10.80% and aspect of total deterioration. There was no germination in vitro of cryopreserved embryonic axes. The method of encapsulation and dehydration is promising for cryopreservation of embryonic axes of *Araucaria* but it is necessary to carry out new studies in order to define a method of cryoconservation of embryonic axes that allows their germination.

Keywords: araucaria, encapsulation, freezing, recalcitrance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1: Partes reprodutivas de *Araucaria angustifolia* (Bertol) O. Kuntze: (A) androstóbilo (ANSELMINI, 2005); Pinha de *Araucaria angustifolia* (B) fechada e (C) aberta. Barra: 1 cm. 21
- FIGURA 2: Semente (A) e embrião (B) de *Araucaria angustifolia* (Bertol) O. Kuntze. Barra: 1 cm 22
- FIGURA 3: Embrião de *Araucaria angustifolia* (Bertol) O. Kuntze: Pontilhado representa área de corte para remoção dos cotilédones (A); Eixo encapsulado com alginato de sódio (B); (Barra: 1 cm) 35
- FIGURA 4- Curva de desidratação em fluxo laminar de eixos embrionários de *Araucaria angustifolia* (Bertol) O. Kuntze..... 36
- FIGURA 5: Criotubos de 2 mL contendo eixos embrionários de *Araucaria angustifolia* (BERTOL) O. Kuntze encapsulados. 37
- FIGURA 6: Aparato Mr. Frosty® Freezing Container (Nalgene) 37
- FIGURA 7: Eixos embrionários de *Araucaria angustifolia* (Bertol) O. Kuntze encapsulados e não criopreservados apresentando a formação de calos (A), germinação (B) e oxidação (C) após 15 dias em meio MS com 3% de carvão ativado, 0,929 μM de cinetina e 11,20 μM de ácido indol-acético. Barra (A e C): 0,5cm. 42
- FIGURA 8: Diferentes graus de oxidação dos eixos embrionários de *Araucaria angustifolia* (Bertol) O. Kuntze encapsulados e submetidos ao congelamento rápido (A) e ao pré-resfriamento até -40°C (B) após 20 dias em meio MS com 3% de carvão ativado, 0,929 μM de cinetina e 11,20 μM de ácido indol-acético. Barra:1 cm. 43
- FIGURA 9: Eixos embrionários de *Araucaria angustifolia* (Bertol) O. Kuntze avaliados pelo teste de tetrazólio. A: eixos encapsulados e não criopreservados; B: eixos criopreservados pelo método rápido; C: eixos criopreservados com pré-congelamento. (Barra: 1cm)..... 45

FIGURA 10: Perfil eletroforético do DNA total extraído de eixos embrionários de *Araucaria angustifolia* (Bertol) O. Kuntze. 0: DNA degradado. 1, 5 e 9: eixos excisados antes da montagem dos testes; 2, 3 e 4: eixos encapsulados após a osmoproteção; 6, 7, e 8: eixos encapsulados submetidos ao congelamento rápido; 10, 11, 12 eixos encapsulados submetidos ao congelamento moderado..... 46

LISTA DE TABELAS

TABELA 01: FORMAÇÃO DE CALO, GERMINAÇÃO E OXIDAÇÃO EM EIXOS EMBRIONÁRIOS DE ARAUCÁRIA APÓS TRATAMENTOS DE CRIOPRESERVAÇÃO (TESTEMUNHA: EIXO ENCAPSULADO E NÃO CRIOPRESERVADO).....	40
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA – Ácido abscísico

AIA – Ácido Indol Acético

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

CTAB – Brometo Cetrimonium

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

h – Horas

H₂O - Água

KIN - Cinetina

LASF – Laboratório de Análises de Sementes Florestais

KNO₃ – Nitrato de Potássio

MS – Murashige e Skoog

NL - Nitrogênio líquido

PVP - Polivinilpirrolidona

PVS – *Plant vitrification solution*

ROS – *Reactive oxygen species*, espécies reativas de oxigênio

TE - Tris + EDTA

Tris – Tris (hidroximetil) aminometano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1	A ESPÉCIE <i>Araucaria angustifolia</i>	19
2.2	INFLORESCÊNCIAS E SEMENTES DE ARAUCÁRIA.....	20
2.3	COMPORTAMENTO RECALCITRANTE DAS SEMENTES.....	22
2.4	CRIOPRESERVAÇÃO.....	23
2.4.1	Definição e aplicações.....	23
2.4.2	Técnicas de criopreservação.....	25
2.4.2.1	Técnica clássica.....	25
2.4.2.2	Técnicas contemporâneas: Vitrificação.....	25
2.4.2.2.1	Gota-vitrificação.....	28
2.4.2.2.2	Encapsulamento-desidratação.....	28
2.4.3	Criopreservação de embriões.....	30
2.4.4	Problemas apresentados pela técnica de criopreservação.....	31
2.4.4.1	Formação de cristais de gelo.....	31
2.4.4.2	Radicais livres e o estresse oxidativo.....	32
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1	MATERIAL VEGETAL.....	34
3.2	DESINFESTAÇÃO E PREPARO DOS EIXOS EMBRIONÁRIOS.....	34
3.3	ENCAPSULAMENTO.....	35
3.3.1	Preparo das cápsulas.....	35
3.3.2	Osmoproteção.....	35
3.3.3	Desidratação.....	35
3.4	Criopreservação.....	36
3.4.1	Descongelamento e desencapsulamento.....	37
3.5	ANÁLISES FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E MOLECULARES.....	37
3.5.1	Integridade do DNA.....	38
3.5.2	Germinação <i>in vitro</i>	38
3.5.3	Teste de Tetrazólio.....	38
3.6	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1	GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>	40
4.2	TESTE DE TETRAZÓLIO	44
4.3	INTEGRIDADE DO DNA.....	46
5	CONCLUSÃO.....	53
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
	REFERENCIAS.....	55
	ANEXO.....	64

1 INTRODUÇÃO GERAL

A desordenada exploração da Floresta Ombrófila Mista levou a uma drástica redução na população de *Araucaria angustifolia* Bertol, a qual é a espécie dominante neste tipo de floresta. A araucária possui um alto interesse ecológico, A madeira serrada e laminada foi, por um longo período, um dos produtos mais importantes na exportação brasileira devido a sua alta qualidade, coloração amarelada, macia, leve e lisa. A madeira é composta de 58,3% de celulose de fibra longa e 28,5% de lignina, podendo assim ser utilizada na produção de papel de alta qualidade e a resina proveniente da casca serve para fabricação de vernizes, terebintina, acetona, ácido pirolenhoso e outros produtos químicos (ANSELMINI, 2005). Os pinhões produzidos servem como uma fonte alimentar tanto para os animais silvestres e domésticos, quanto para o homem, sendo uma rica fonte de energia (ANSELMINI, 2005).

Atualmente, a Floresta Ombrófila Mista está reduzida a cerca de 2% de sua área original e a araucária é considerada uma espécie em extinção (BITTENCOURT, 2007; ALARCON, 2011). A principal limitação da maioria dos métodos de propagação vegetativa para a araucária deve-se ao número reduzido de brotos ortotrópicos (crescimento vertical) que a espécie produz, sendo a maioria brotações com crescimento plagiotrópico (crescimento horizontal, similar a um ramo lateral) (PIRES, 2012).

As sementes de araucária são recalcitrantes, o que dificulta a sua conservação, portanto perdem rapidamente a viabilidade após a colheita (CARVALHO, 1994; CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). A técnica de criopreservação, que consiste no congelamento de tecidos vegetais a temperatura baixa, de -196°C , é a forma mais adequada para a conservação de sementes de espécies recalcitrantes (ENGELMANN, 2000). O metabolismo das células em temperaturas baixas é reduzido, não ocorrendo à deterioração do material vegetal. Após o descongelamento, as atividades metabólicas voltam a ocorrer normalmente (SANTOS, 2000; ENGELMANN, 2004; BERJAK e PAMMENTER, 2008; BENSON, 2008; BERJAK *et al.*, 2011).

A criopreservação vem sendo muito utilizada para a conservação de diversas espécies florestais (WETZEL *et al.*, 2009) e diversas formas de crioconservação

vêm sendo desenvolvidas com o passar dos anos. Técnicas clássicas, como o resfriamento lento, obtiveram muito sucesso no século passado, mas a utilização do encapsulamento e soluções crioprotetoras se tornou essencial para a conservação de algumas espécies, principalmente para as tropicais e subtropicais. O encapsulamento-desidratação tem sido a técnica de crioproteção mais promissora para espécies tropicais e subtropicais com sementes recalcitrantes. Fornece uma maior proteção do material vegetal, por meio de uma barreira física composta pela cápsula de alginato e uma desidratação da célula em busca de um estado vítreo (SANTOS, 2001; ENGELMANN *et al.*, 2008; FERNANDES, 2008; KAMI, 2012).

Na literatura, há várias informações para espécies florestais, sendo observada uma metodologia específica e cada etapa do processo deve ser adequada para o indivíduo a ser estudado. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de eixos embrionário de *Araucária angustifolia* (Bertol) O. Kuntze em relação a duas metodologias de criopreservação, o congelamento rápido e o pré-resfriamento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A ESPÉCIE *Araucaria angustifolia*

Araucaria angustifolia (Bertoloni) Otto Kuntze, também conhecida como pinheiro-do-paraná, pinheiro brasileiro, pinho-do-paraná, pinheiro ou araucária, é a única espécie do gênero *Araucaria* de ocorrência natural no Brasil (CARVALHO, 1994). A distribuição da espécie no país vai desde o oeste do Estado de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, estando as maiores áreas de concentrações nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (CARVALHO, 2002). A araucária é uma espécie que pertence à Floresta das Araucárias ou Floresta Ombrófila Mista, a qual faz parte do Bioma Mata Atlântica. No século passado, a exploração deste bioma foi intensa e atualmente estima-se que restam aproximadamente 2% de sua área original (MANTOVANI *et. al.*, 2004; ALARCON, 2011).

Como a araucária apresenta uma ampla distribuição geográfica natural, são encontradas diversas variedades (SOUSA e AGUIAR, 2012). Segundo Anselmini (2005) são descritas nove variedades, cujas diferenças baseiam-se na coloração e época de amadurecimento dos pinhões e, em alguns casos, na forma dos seus ramos e folhas. A variedade *A. angustifolia sancti-josephi* Reitz & Klein, conhecida como pinheiro-são-josé, é a primeira a ter suas sementes maduras, de fevereiro a março e a variedade *alba* Reitz & Klein, chamada de pinheiro-branco, apresenta pinhões brancos ou brancos-amarelados, que quando secos tornam-se amarelados (REITZ e KLEIN, 1966).

A variedade *angustifolia* (Bertol.) Kuntze possui pinhões vermelhos que amadurecem de abril a maio e a variedade *indehiscens* Mattos, conhecida como pinheiro-macaco, mantém suas sementes presas aos ramos mesmo após o amadurecimento dos pinhões, chegando até a germinar, os pinhões desta variedade são bem menores do que os das outras e a maturação ocorre de setembro até janeiro (KOCH e CORRÊA, 2002; CARVALHO, 1994; ANSELMINI, 2005). A variedade var. *nigra* Reitz & Klein, nome comum pinheiro-preto, tem pinhões de coloração vermelho-escuro, quase preto e a variedade *caiova* Reitz & Klein, conhecida como pinheiro-caiova, tem seus pinhões maduros entre junho e julho. A

característica principal desta variedade é o tempo do amadurecimento das sementes, o qual ocorre após a época normal (ANSELMINI, 2005). A variedade *estriata* Reitz & Klein corresponde ao pinheiro-rajado por apresentar pinhões vermelhos com listras vermelho-escuro e a var. *semi-alba* Reitz & Klein, ou pinheiro-de-ponta-branca, pinhões a princípio com a ponta branca, que mais tarde se tornam totalmente vermelhos (REITZ e KLEIN, 1966; CARVALHO, 1994; ANSELMINI, 2005). A variedade *elegans* (Hort.) Reitz & Klein é chamada pinheiro-elegante, apresentando ramos delgados e numerosos, com folhas menores e mais densas (REITZ e KLEIN, 1966; CARVALHO, 1994; KOCH e CORRÊA, 2002; ANSELMINI, 2005).

A araucária é uma gimnosperma, possui uma copa alta, estratificada e múltipla, caliciforme nas árvores mais velhas e cônica nas mais jovens (CARVALHO, 2002). De porte grande, atingindo em média de 20 a 25 m de altura. Seu tronco é geralmente cilíndrico, reto, raras vezes ramificado, com casca grossa e resinosa (CARVALHO, 2002). É uma planta dióica, com árvores masculinas e femininas distintas e raramente é monóica por trauma ou doenças (REITZ e KLEIN, 1966; ANSELMINI, 2005).

2.2 INFLORESCÊNCIAS E SEMENTES DE ARAUCÁRIA

As inflorescências se desenvolvem na extremidade dos ramos. A estrutura reprodutiva masculina é conhecida como androstróbilo ou mingote (FIGURA 1A), os androstróbilos são alongados com escamas e em seu interior possuem sacos polínicos (FERRI, 1983; ANSELMINI, 2005). Passam por todos os estágios de desenvolvimento durante o ano, entre fevereiro e agosto. São de cor verde e seu eixo longitudinal é reto no início de seu desenvolvimento (MANTOVANI, 2004; ANSELMINI, 2005). Com sua maturação, geralmente em setembro e outubro, os androstróbilos começam a ficar com coloração amarelada até castanha e seu eixo começa a se curvar, quando estão maduros; nessa época, os grãos de pólen saem e o ciclo reprodutivo nas plantas masculinas encerra-se (FERRI, 1983; SOUSA e HATTEMER, 2003; MANTOVANI, 2004; ANSELMINI, 2005).

O ginostrobilo é a parte feminina da planta, conhecida como pinha (FIGURA 1 B e C) (ANSELMINI, 2005). É composto por numerosas folhas carpelares (megaesporófilo) inseridas ao redor de um eixo cônico, sua forma é arredondada com coloração verde (FERRI, 1983; ANSELMINI, 2005). Árvores femininas apresentam estruturas reprodutivas durante o ano todo, mas em épocas de maturação distintas o seu ciclo de desenvolvimento demora cerca de 3 anos (SOUSA e HATTERMER, 2003; MANTOVANI, 2004).

A polinização da araucária ocorre geralmente em setembro e outubro quando os ginostrobilos estão abertos, sua polinização é principalmente pelo vento, mas uma ave conhecida como grimpeirinho (*Leptastheunura setaria*) também age como polinizador durante a procura por alimento entre as folhas das árvores (CARVALHO, 2002; ANSELMINI, 2005).



FIGURA 1: Partes reprodutivas de *Araucaria angustifolia* (Bertol) O. Kuntze: (A) androstóbilo (ANSELMINI, 2005); Pinha de *Araucaria angustifolia* (B) fechada e (C) aberta. Barra: 1 cm.

A semente da *A. angustifolia* é popularmente conhecida como pinhão, sendo um alimento rico em proteínas e carboidratos (CARVALHO, 2002). O pinhão possui uma forma cônica, com seu ápice voltado para o eixo central da pinha, com comprimento aproximado de 3-8 cm e 1-2 cm de diâmetro (ANSELMINI, 2005). É composto por endosperma, tegumento e embrião, a amêndoa branca ou rosa-clara é constituída principalmente de matéria amilácea (REITZ e KLEIN, 1966). No centro encontra-se o embrião, longo e cilíndrico (FIGURA 2), com dois grandes cotilédones, que perfazem 80% do tamanho final do embrião o restante do embrião, é composto pelo eixo hipocótilo-radícula (REITZ e KLEIN, 1966). Na inserção dos cotilédones encontra-se o púlvino meristemático que formará o caulículo (REITZ e KLEIN, 1966).

2.3 COMPORTAMENTO RECALCITRANTE DAS SEMENTES

As sementes de *Araucaria angustifolia* apresentam comportamento recalcitrante, portanto perdem rapidamente a viabilidade após a colheita (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). As sementes das espécies vegetais são divididas em dois grandes grupos: no primeiro estão às espécies ortodoxas e no segundo as recalcitrantes, considerando a capacidade de suas sementes suportarem a dessecação no final do desenvolvimento e posterior armazenamento (ROBERTS, 1973). Porém, alguns autores consideram um terceiro grupo: as espécies que suportam a secagem até 8 a 11% de umidade, mas que não toleram baixas temperaturas durante período de tempo prolongado (ELLIS *et al.*, 1991; CARVALHO, 2006b).

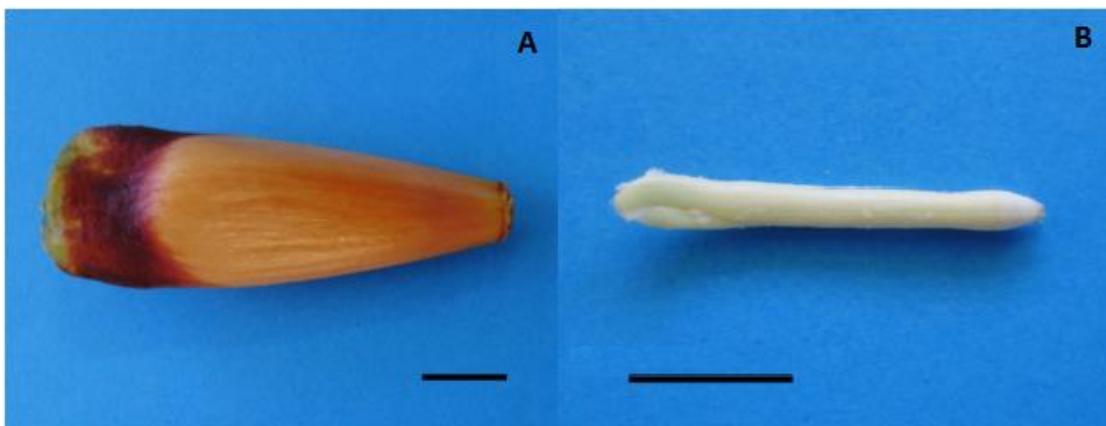


FIGURA 2: Semente (A) e embrião (B) de *Araucaria angustifolia* (Bertol) O. Kuntze. Barra: 1 cm

As sementes ortodoxas adquirem tolerância à dessecação durante o desenvolvimento, podem secar suportando teores baixos de umidade (2 a 5%) (ROBERTS, 1973). Elas se mantêm viáveis após dessecação e podem ser armazenadas sob baixas temperaturas por um longo período (ROBERTS, 1973). Sementes ortodoxas apresentam um padrão característico de desenvolvimento havendo um período natural de secagem (PAMMENTER e BERJAK, 1999b; BERJAK, *et al.*;2011).

As sementes recalcitrantes perdem a viabilidade ao serem secas a teores de água relativamente altos (12 a 31%) reduzidos, sendo sensíveis à dessecação e metabolicamente ativas (ROBERTS, 1973; PAMMENTER e BERJAK, 1999a). As

sementes recalcitrantes apresentam um padrão de desenvolvimento indeterminado e incompleto quando comparadas às ortodoxas, sendo as sementes liberadas antes que a tolerância à dessecação seja adquirida (PAMMENTER e BERJAK, 1999a).

Pammenter e Berjak (1999b) indicaram que, durante o processo de desidratação de sementes recalcitrantes, é necessário compreender as atividades que ocorrem nos diferentes níveis de hidratação e os mecanismos e processos para combater possíveis efeitos deletérios da remoção de água. Diferentes processos podem conferir proteção contra as consequências de perda de água nos mais diferentes níveis de hidratação. A ausência ou ineficácia destes processos ou mecanismos determina o grau relativo de sensibilidade à dessecação. Características físicas como redução do grau de vacuolização, o montante e a natureza das reservas acumuladas e a conformação do DNA, que fazem parte dos mecanismos de reidratação e a presença e o funcionamento de sistemas antioxidantes, são mecanismos ou processos que auxiliam na tolerância a dessecação (PAMMENTER e BERJAK, 1999b).

Algumas espécies que possuem sementes recalcitrantes, como *Inga vera* (BONJOVANI e BARBEDO, 2008), *Calophyllum brasiliense*, *Calyptanthes lucida*, *Cupania vernalis*, *Eugenia handroana* (CARVALHO *et al.*, 2006), possuem alto valor econômico e ambiental. Essas espécies, principalmente as florestais de clima tropical e sub-tropical, não toleram a dessecação, sendo difícil armazenar suas sementes. Estima-se que 8% das 20.000 espécies da flora mundial sejam classificadas como recalcitrantes (ROYAL BOTANIC GARDENS KEW, 2008). Como não é possível armazenar sementes de espécies recalcitrantes por um período longo de tempo devido à perda de viabilidade e de água e à dificuldade de armazenamento, a criopreservação surge como uma alternativa para conservar material vegetal recalcitrante por períodos prolongados de tempo, sem afetar a sua viabilidade (SOUZA *et al.*, 2009).

2.4 CRIOPRESERVAÇÃO

2.4.1 Definição e aplicações

A criopreservação consiste no armazenamento de material biológico a temperaturas ultrabaixas, sendo utilizado o nitrogênio líquido (NL) (-196°C) ou sua fase a vapor (-150 °C) (SANTOS, 1999; BERJAK e PAMMENTER, 2008; BENSON, 2008; BERJAK *et al.*, 2011). É uma técnica utilizada para assegurar a conservação a longo prazo, em temperaturas ultrabaixas, todas as divisões celulares e atividades metabólicas sendo cessadas (BERJAK e PAMMENTER, 2008; BENSON, 2008; BERJAK *et al.*, 2011). Abaixo de -140°C, as taxas de reações químicas e biofísicas são lentas, favorecendo a sobrevivência celular, e o material criopreservado poderá ser recuperado sem adquirir lesões letais (ZELIANG e PATTANAYAK, 2012). O material vegetal pode, assim, ser armazenado sem alteração ou modificação durante um período teoricamente ilimitado de tempo (SANTOS, 1999; GUERRA e POMPELLI, 2001; ENGELMANN, 2004; BERJAK e PAMMENTER, 2008; BENSON, 2008; BERJAK *et al.*, 2011). Segundo Withers e Williams (1998), apesar de todos os processos como os da respiração e atividades enzimáticas estarem inativados no material criopreservado, podem ocorrer danos cumulativos, resultantes da formação de cristais de gelo e da atividade de radicais livres.

Para Engelmann (1997), Kami (2012) e Zeliang e Pattanayak (2012), a criopreservação é o método ideal para conservação de germoplasma em um espaço pequeno e com pouca manutenção, sendo mantidas as características do material criopreservado.

Protocolos de criopreservação têm sido desenvolvidos para numerosas espécies de plantas (SANTOS, 2001). Sementes de espécies florestais como a aroeira (*Astronium urundeuva*), o ipê roxo (*Tabebuia impetiginosa*), a barauna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.) e embriões de *Araucaria hunsteinii* foram criopreservados por desidratação e imersão direta em NL (PRITCHARD e PRENDERGAST; 1986; MEDEIROS e CAVALLARI, 1992; GONZAGA *et al.*, 2003; MARTINS *et al.*, 2009). Linhas embriogênicas de carvalho (*Quercus robur*) foram criopreservadas utilizando soluções crioprotetoras como a PVS2 em diferentes períodos de tempo, obtendo, no final, a recuperação das plantas (SANCHEZ *et al.*, 2008). Diferentes técnicas têm sido utilizadas incluindo a criopreservação de protoplastos, suspensões celulares, calos, gemas apicais e laterais, meristemas, sementes, embriões somáticos e zigóticos, assim, diferentes procedimentos de criopreservação foram desenvolvidos (KAMI, 2012).

2.4.2 Técnicas de criopreservação

2.4.2.1 Técnica clássica

Os primeiros protocolos de criopreservação de tecidos vegetais utilizavam resfriamento em duas fases, a primeira consistia em um resfriamento lento, até uma temperatura de pré-congelamento de -30 a -40°C, a uma velocidade definida entre 1 e 10 °C/h usando-se um congelador programável, seguido de imersão direta em NL (ENGELMANN, 1997). Essa técnica foi baseada nos eventos físico-químicos que ocorrem durante o processo de congelamento em condições naturais (MAZUR, 1963; ENGELMANN, 1997; SANTOS, 2001; ENGELMANN, 2004; CARVALHO, 2006). A função do resfriamento lento é permitir a criodesidratação das células sem ocorrer a formação de cristais de gelo (ZELIANG e PATTANAYAK, 2012).

À medida que a temperatura decresce, aproximando-se de 0 °C, a célula e seu meio externo atingem um estado de super-resfriamento (*supercooling*), em seguida ocorre a formação de gelo no meio extracelular (SANTOS, 1999). O conteúdo da célula super-resfriada permanece descongelado, possivelmente porque a parede celular e a membrana plasmática impedem que os cristais de gelo presentes nos espaços intercelulares penetrem na célula e desencadeiem o congelamento do citoplasma (SANTOS, 1999; SANTOS, 2001). Se o resfriamento ocorre lentamente, a água se difunde do interior da célula super-resfriada para o meio externo devido à diferença de pressão do vapor da água (maior pressão dentro da célula que nos espaços intercelulares congelados), a água é convertida em gelo na superfície das células, o que é chamado de desidratação induzida por congelamento (*freeze-induced desiccation*) (SANTOS, 2001; ENGELMANN, 2004; CARVALHO, 2006;).

2.4.2.2 Técnicas contemporâneas: Vitrificação.

A vitrificação, ou formação do estado vítreo, é o processo pelo qual a água sofre uma transição da fase líquida para um estado sólido amorfo e meta-estável, evitando a formação de gelo cristalino (SANTOS, 2001; ENGELMANN *et al.*, 2008). A transição para o estado vítreo não envolve mudanças químicas, mas apenas

mudanças físicas na viscosidade do líquido (SANTOS, 2001). Refere-se ao processo pelo qual um material altamente concentrado (solução vitrificante) resfria a temperaturas muito baixas (SAKAI e ENGELMANN, 2007). O sólido assim formado é uma solução super saturada e de alta viscosidade, que lhe confere as propriedades mecânicas de um sólido embora não haja formação de uma estrutura cristalina (SANTOS, 1999).

Sete tipos de criopreservação com vitrificação são citados na literatura: encapsulamento com desidratação; vitrificação simples; encapsulamento com vitrificação; desidratação; pré crescimento; pré-crescimento com desidratação e gota-vitrificação (*vitrification droplet*) (SAKAI e ENGELMANN, 2007; SANCHEZ *et al.*, 2008; KAMI, 2012).

As soluções vitrificantes mais utilizadas são designadas PVS (SAKAI e ENGELMANN, 2007). Dentre elas está a solução denominada PVS₁ composta por glicerol (220 g L⁻¹), etileno glicol (150 g L⁻¹), propileno glicol (150 g L⁻¹), dimetil sulfóxido (DMSO) (70 g L⁻¹) e sorbitol (91,0 g L⁻¹) (KAMI, 2012). A PVS₂ é composta por meio MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962) suplementado com 0,4 M sacarose, 30% (v/v) glicerol, 15% (v/v) etilenoglicol e 15% (v/v) DMSO (SAKAI *et al.*, 1990). A solução conhecida como PVS₃ é composta por solução nutritiva contendo sais e vitaminas do meio MS e adicionada de 40% (v/v) de glicerol e 40% (v/v) de sacarose (SAKAI e ENGELMANN, 2007).

Outras soluções vitrificantes utilizam apenas açúcares o qual esta relacionado com a aquisição da tolerância à desidratação (SANTOS, 2001). Os açúcares podem agir como agentes osmóticos externos, removendo o excesso de água intracelular mediante um gradiente osmótico (¹DUMET *et al.*, 1993 apud SANTOS, 2001). Sugere-se que eles sejam excelentes agentes vitrificadores, seu efeito protetor sendo atribuído à vitrificação das membranas celulares e das biomoléculas (HIRSH, 1987; SANTOS, 2001) ou podem substituir a água removida das biomoléculas, mantendo as estruturas hidrofílicas na sua orientação hidratada e

¹ DUMET, D.; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y.; DEREUDDRE, J. 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.

evitando perda de funcionalidade, mesmo depois da água ter sido removida (²CROWE *et al.*, 1988 apud SANTOS, 2001).

O processo de vitrificação tornou-se um dos principais métodos de crioproteção para estruturas complexas, tendo sido aplicado a uma ampla variedade de tecidos vegetais (SANTOS, 2001; KAMI, 2012). Linhas embriogênicas de carvalho (*Quercus robur*) foram criopreservadas com solução PVS2 e apresentaram taxas de sobrevivência de 70% (MARTÍNEZ *et. al.*; 2003). Embriões maduros de coco (*Cocos nucifera* L.) sobreviveram à criopreservação em soluções contendo glicose e glicerol (ASSY-BAH e ENGELMANN, 1992). Ápices de caqui (*Diospyros kaki* Thunb) retornaram ao crescimento dez dias após a imersão em NL sendo osmoprotetidos com sacarose e glicerol (MATSUMOTO *et. al.*, 2001).

Uma vantagem da vitrificação é poder congelar rapidamente os tecidos vitrificados pelo mergulho direto em NL, eliminando a necessidade de se usarem congeladores programáveis (SANTOS, 2001). Durante o rápido decréscimo da temperatura, em contraste com o resfriamento lento, não há tempo suficiente para o crescimento de cristais de gelo no espaço intracelular e, com isso, as células passam rapidamente pela zona de temperatura na qual o crescimento letal de cristais de gelo ocorreria (³LUYET, 1937 apud SANTOS, 2001). Além disso, os protocolos baseados na vitrificação simplificam o procedimento de crioproteção e permitem que explantes complexos contendo diversos tipos de células sobrevivam à exposição ao NL (PAULET *et al.*, 1993; SANTOS, 2001). O ponto crítico para obter sobrevivência usando protocolos de vitrificação é a desidratação e não o congelamento; se a amostra for desidratada até o teor de água tolerado, obtém-se alta sobrevivência na maioria dos casos (ENGELMANN *et al.*, 1997; SANTOS, 2001).

Outro ponto importante é quantificar o tempo ideal da exposição das amostras à solução vitrificante. O aumento da tolerância à solução vitrificante pode ser conseguido por meio de pré-condicionamento de cultura e de tratamentos de saturação ou “loading” (FERNANDES, 2008). Como pré-condicionamento, existem duas possibilidades, a aclimatação a frio e a cultura em meio rico em açúcares ou

² CROWE, J.H.; CROWE, L. M.; CARPENTER, J.F.; RUDOLPH, A.S.; AURELL WISTROM, C.; SPARGO, B.J.; ANCHORDOGUY, T.J.; Interactions of sugars with membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 947, p. 367-384. 1988.

³ LUYET, B.J. The vitrification of organic colloids and of protoplasts. *Biodynamic*. v. 1, p.1. 1937.

ambos (FERNANDES, 2008). Para muitas espécies, a pré-cultura em meio rico em sacarose parece não ser suficiente para aumentar a tolerância à solução vitrificante, para outras espécies, a exposição direta à solução vitrificante concentrada pode ser tóxica (FERNANDES, 2008).

2.4.2.2.1 Gota-vitrificação

De acordo com Fernandes (2008), o método de gota-vitrificação deriva do método de vitrificação e foi utilizado pela primeira vez em 1997 por Schäfer-Menuhr. Este método é conhecido por ser eficiente para várias espécies, permitindo taxas de regeneração mais elevadas, comparativamente aos outros métodos de vitrificação existentes (SAKAI e ENGELMANN, 2007; FERNANDES, 2008).

No método gota-vitrificação, o explante é colocado em uma tira de alumínio e em seguida é adicionada uma gota da solução crioprotetora no explante e, então, é feita a imersão em NL. Após, o material é colocado no criotubo para a criopreservação (SAKAI e ENGELMANN, 2007). Este protocolo é semelhante ao utilizado no método de vitrificação, ou seja, utiliza-se um pré-tratamento, solução “loading”, exposição a PVS₂. O principal interesse a destacar nesta técnica é a possibilidade de atingir altas taxas de resfriamento / aquecimento utilizando um pequeno volume de solução vitrificante. Embora ainda seja uma técnica muito recente e pouco utilizada, a vitrificação “droplet” é um método promissor (FERNANDES, 2008).

2.4.2.2.2 Encapsulamento-desidratação

Esse método é baseado na produção de sementes sintéticas, neste procedimento, o material vegetal é inserido em cápsulas de alginato de cálcio (SANTOS,1999). O desenvolvimento recente desta técnica criogênica facilita a criopreservação, a matriz polimérica que circunda o tecido vegetal promovendo a sua regeneração após descongelamento (SANTOS,1999; FERNANDES, 2008). O encapsulamento dos explantes auxilia na tolerância a soluções com elevadas concentrações de sacarose e a desidratação a um baixo teor de umidade que seria

altamente prejudicial ou letal para as amostras não encapsulados. Devido à extrema desidratação dos explantes a maior parte ou toda a água congelável é removida das células e a vitrificação dos solutos internos ocorre durante a imersão rápida em NL, assim evitando cristalização do gelo intracelular (ENGELMANN et al., 2008). A resistência à desidratação e ao congelamento é induzida pela pré-cultura do tecido encapsulado em meio enriquecido com sacarose ou outro crioprotetor antes da desidratação (SANTOS, 2001; SANTOS, 1999; BANDUPRIYA et al., 2007; FERNANDES, 2008; ENGELMANN et al., 2008; KAMI, 2012). A sacarose provoca uma desidratação parcial antes da exposição a baixas temperaturas (SANTOS, 2004). Explantes encapsulados são muito fáceis de manipular durante todo o protocolo de criopreservação e o encapsulamento e desidratação foi implementada com sucesso em um grande número de espécies, tanto a partir de origem de clima temperado e tropical (ENGELMANN, 2008).

Plúmulas de embriões de coco (*Cocos nucifera* L.) foram encapsuladas e tratadas com diversas concentrações de ABA que funciona como um crioprotetor; Com este tratamento aumentou a taxa de sobrevivência das plúmulas (BANDUPRIYA et al., 2007). Santos (2004) criopreservou eixos embrionários de diferentes espécies de *Citrus* utilizando a mesma técnica de encapsulamento, mas com diferentes agentes crioprotetores, obtendo resultados satisfatórios.

A técnica de encapsulamento proporciona algumas vantagens, entre as quais a facilidade de armazenamento e de manuseio e aumento do potencial de armazenamento a longo prazo sem perder a viabilidade e as cápsulas podem ser colocadas diretamente em cultura (SANTOS, 1999; SANTOS, 2001; ENGELMANN et al., 2008; FERNANDES, 2008; KAMI, 2012).

Engelmann et al. (2008) descreveram as etapas sucessivas do protocolo de encapsulamento-desidratação, que otimizam a máxima recuperação dos explantes após a criopreservação. Essas etapas, como pré-condicionamento, pré-cultura, osmoproteção e desidratação, se aplicam em todos os casos antes do resfriamento (ENGELMANN et al., 2008). O alginato de sódio, na presença de cátions di e trivalentes, complexa-se e forma o alginato de cálcio; os cátions metálicos formam ligações iônicas entre o ácido carboxílico das moléculas de ácido gulurônico do alginato (REDENBAUGH et al., 1986; GUERRA et al., 1999). A resistência e dureza da cápsula são funções da proporção entre os ácidos gulurônico e manurônico, os cátions e o tempo de complexação (REDENBAUGH et al., 1986; GUERRA et al.,

1999). A polimerização pode ser controlada visualmente; inicialmente, as capsulas são translúcidas e, conforme a polimerização progride, tornam-se opacas (ENGELMANN *et al.*, 2008).

2.4.3 Criopreservação de embriões

De acordo com Fernandes (2008), para a criopreservação de sementes torna-se necessário criar alternativas, especialmente quando se trata de espécies em vias de extinção, pois o número de sementes disponíveis é reduzido.

Geralmente, as sementes recalcitrantes são grandes e apresentam elevada quantidade de água a ser retirada, devido ao seu tamanho; a perda de água congelável é lenta, o que deixa as sementes expostas por mais tempo à ação de radicais livres deletérios gerados pela própria perda de água (BERJAK e PAMMENTER, 2001). Como as sementes recalcitrantes não possuem mecanismos antioxidantes, sua viabilidade é comprometida, sendo assim, a mínima remoção de água deve ser rápida (BERJAK e PAMMENTER, 2001). Quando o objetivo é a conservação de germoplasma, a semente é o material preferencial para estabelecer a cultura *in vitro* e propagar plantas. Assim, a criopreservação de sementes é uma técnica interessante para uma estratégia de conservação (FERNANDES, 2008).

Em comparação com outros sistemas de cultura, pouca atenção tem sido dada à criopreservação de embriões, porém o interesse na embriogênese somática esta crescendo (WITHERS e WILLIAMS, 1998). A criopreservação de embriões e eixos embrionários excisados têm gerado bons resultados, pois a área é menor, o que permite uma rápida perda de água a baixa temperatura (BERJAK e PAMMENTER, 2008). Mesmo assim, deve ser levado em consideração que as diferentes partes da semente variam quanto à tolerância à dessecação, sendo os eixos embrionários considerados os mais sensíveis (BERJAK e PAMMENTER, 2008). O congelamento a seco preserva com sucesso embriões em estádios relativamente avançados de desenvolvimento, à medida que a taxa de resfriamento é reduzida, levando a uma maior desidratação (WITHERS e WILLIAMS, 1998). Na manipulação de embriões a serem criopreservados e posteriormente germinados, alguns pontos devem ser levados em consideração: a ocorrência de danos no momento de excisão, o prévio tratamento químico para eliminar microrganismos que

estejam presentes, a duração da secagem rápida, o uso de substâncias crioprotetoras, a etapa de descongelamento e a definição de um protocolo para a germinação *in vitro* e o estabelecimento das plântulas (BERJAK e PAMMENTER, 2001; 2008).

Uma das aplicações mais promissoras da criopreservação de embriões, provavelmente, será na conservação genética de espécies com sementes recalcitrantes. Como os embriões de sementes recalcitrantes normalmente são muito grandes quando comparados aos de outras espécies criopreservadas, meristemas excisados das sementes, ou embriões secundários induzidos (menor tamanho) seriam mais adequados (WITHERS e WILLIAMS, 1998).

2.4.4 Problemas apresentados pela técnica de criopreservação

2.4.4.1 Formação de cristais de gelo

O congelamento da água ocorre em temperaturas abaixo de zero, a menor temperatura de super resfriamento possível na maioria dos sistemas biológicos sendo o ponto de nucleação do gelo, o que ocorre em torno de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (BENSON, 2008). Nessa temperatura, as moléculas de água formam um "embrião de gelo" capaz de formar um cristal, após este evento inicial, os cristais de gelo têm a capacidade de crescer, formando redes complexas que podem aumentar exponencialmente. A nucleação do gelo afeta a integridade estrutural, osmótica e coligativa das células, o que causa rupturas físicas e danos mecânicos. Danos coligativos resultam do excesso de concentrações de soluto que comprometem a função celular (BENSON, 2008). Dois mecanismos podem promover o dano à estrutura celular e conduzir diretamente à diminuição da firmeza do tecido vegetal: o primeiro está relacionado com a possibilidade de perfuração da membrana celular pelo cristal de gelo intracelular, contribuindo para a redução da pressão de turgor, já o segundo relaciona-se com a quebra da estrutura da parede celular pelo cristal formado no meio extracelular, podendo ocorrer o colapso celular (CARNEIRO e CAL-VIDAL, 2000; SANTOS, 2001).

É difícil evitar a formação dos cristais de gelo uma vez que alguns tecidos vegetais usados apresentam altos teores de água em suas células, como calos,

embriões zigóticos ou somáticos, gemas apicais e laterais, sementes e suspensões celulares (SANTOS, 2001). Extensiva formação de cristais de gelo intracelular irá ocorrer caso estes tecidos sejam congelados no estado hidratado; assim, a água precisa ser removida antes do congelamento, para evitar a injúria causada pelos cristais de gelo (SANTOS, 2001; ENGELMANN, 2010). A desidratação, que parece ser simples, é um processo importante, porque a água tem muitas funções biológicas (SANTOS, 2001).

2.4.4.2 Radicais livres e o estresse oxidativo

Os radicais livres são moléculas altamente reativas que podem causar uma ampla gama de danos nas células, durante os procedimentos de criopreservação (KACZMARCZYK, 2012). Tecidos de plantas são sensíveis a uma variedade de tensões, incluindo o estresse oxidativo (KACZMARCZYK, 2012). A formação de espécies reativas do oxigênio (ROS) pode ocorrer durante as várias etapas do processo de criopreservação (BECKETT *et al.*; 2004; BECKETT *et al.* 2005). Por exemplo, foi detectado estresse fotooxidativo durante a excisão de ápices, lesão osmótica e secagem após a aplicação de agentes crioprotetores, durante a rápida mudança de temperatura quando as amostras são criopreservadas e após o reaquecimento (BECKETT e MINIBAYEVA, 2003; BECKETT *et al.*; 2004; BECKETT *et al.* 2005; KACZMARCZYK, 2012).

Os radicais livres mais reativos encontrados em plantas incluem superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($OH\bullet$), o hiperóxido (OOH) e espécies reativas de oxigênio (ROS). Todos os radicais livres ativos são moléculas que contêm um elétron não emparelhado e que reagem inespecificamente com moléculas vizinhas, removendo elétrons e causando uma reação em cadeia de formação de radicais. A remoção dos elétrons pode conduzir a uma perda de função e alterações estruturais em macromoléculas como as proteínas, os lipídios e o DNA. Frequentemente ROS são produzidos como subprodutos durante o metabolismo celular como respiração e fotossíntese. A formação de ROS é controlada pela ação de antioxidantes e proteínas que podem extinguir estas moléculas e reparar os danos causados. Reduzir temporariamente a exposição da amostra criopreservada à luz leva a um aumento da sobrevivência, devido à diminuição do estresse foto-oxidativo, o que

evita elevados níveis de oxigênio singlet e superóxido (O_2^-) (BECKETT e MINIBAYEVA, 2003; BECKETT *et al.* 2005; KACZMARCZYK, 2012).

A quantificação de ROS é dificultada pela alta reatividade de curta duração das moléculas. Desta forma é mais fácil medir a formação de produtos dos danos oxidativos ou a capacidade antioxidante da célula. A quantificação de antioxidantes é uma boa indicação da capacidade das células de regular o estresse oxidativo e a quantificação de produtos finais da oxidação dos ROS é uma indicação dos danos causados (GOUVEIA 2007; KACZMARCZYK, 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Análise de Sementes Florestais (LASF) e nos laboratórios de Cultura de Tecidos e Transformação da Embrapa Florestas, localizado em Colombo (Paraná) e no Laboratório de Micropropagação de plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, localizada em Curitiba (Paraná).

3.1 MATERIAL VEGETAL

Pinhas de araucária (*Araucaria angustifolia* Bertol O. Kuntze) que estavam no ponto de coleta, foram coletadas na área experimental de teste de procedências e progênies localizada na Embrapa Florestas. As sementes retiradas das pinhas foram armazenadas em sacos plásticos transparentes de 20 micra de espessura, os quais foram colocados em câmara fria (5°C) com 89% de umidade relativa, durante o período de realização dos experimentos.

3.2 DESINFESTAÇÃO E PREPARO DOS EIXOS EMBRIONÁRIOS

O tegumento das sementes foi removido e em seguida as mesmas foram desinfestadas com uma solução de hipoclorito 3% adicionado de 1% de Tween 20[®] durante 20 minutos. Posteriormente, as sementes foram lavadas três vezes com água destilada autoclavada para a remoção da solução desinfestante. Com o auxílio de um bisturi e pinça. O embrião foi excisado e os colitédones removidos. Os eixos embrionários foram colocados em placa de Petri com papel filtro umedecido para evitar a perda de umidade.

3.3 ENCAPSULAMENTO

3.3.1 Preparo das cápsulas

Para o encapsulamento, os eixos embrionários foram colocados em uma solução contendo sais e vitaminas MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), 0,4 M de sacarose e 3% de alginato de sódio, durante quinze minutos. Os eixos foram resgatados com o auxílio de uma pipeta e transferidos para uma solução estéril de 100 μ M de CaCl_2 , onde permaneceram por 30 minutos, para a formação da cápsula de alginato (FIGURA 3). As cápsulas foram lavadas com água destilada autoclavada para a remoção do excesso de CaCl_2 .

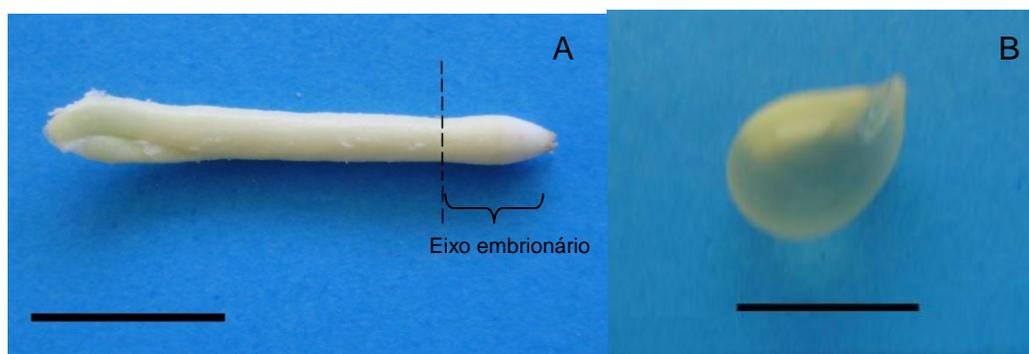


FIGURA 3: Embrião de *Araucaria angustifolia* (Bertol) O. Kuntze: Pontilhado representa área de corte para remoção dos cotilédones (A); Eixo encapsulado com alginato de sódio (B); (Barra: 1 cm)

3.3.2 Osmoproteção

As cápsulas contendo os eixos embrionários foram colocadas em meio de cultura estéril contendo sais e vitaminas MS e 0,7M de sacarose. Este meio, contendo elevada concentração de sacarose, teve a função de auxiliar na desidratação do material vegetal. As cápsulas permaneceram nesta solução por dois dias em incubadora, com agitação de 80 rpm, em temperatura de 25 ± 2 °C e no escuro.

3.3.3 Desidratação

Após a osmoproteção, as cápsulas foram secas sobre papel filtro estéril para remoção de líquido restante e mantidas em câmara de fluxo laminar durante 30 minutos até atingirem a umidade de 80% como representado na Figura 4.

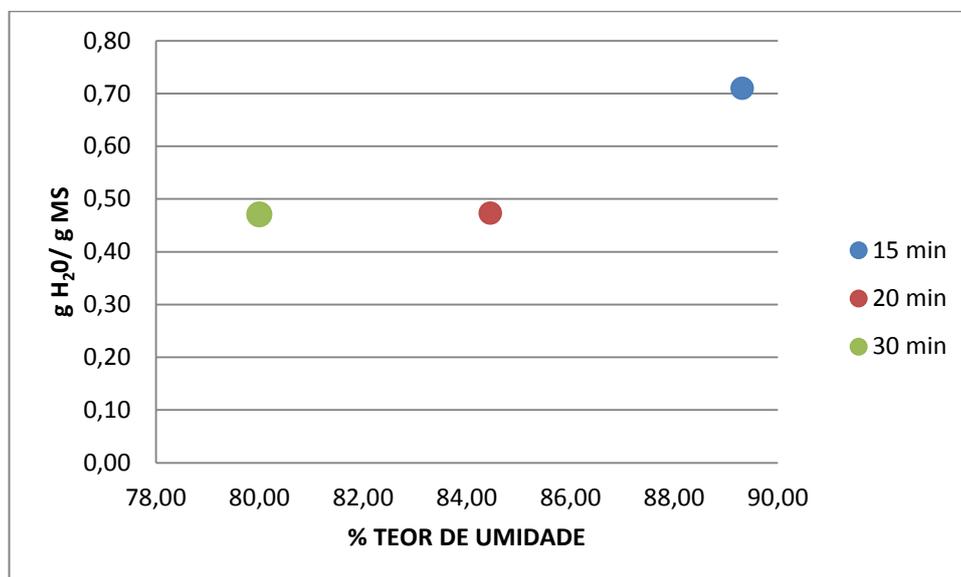


FIGURA 4- Curva de desidratação em fluxo laminar de eixos embrionários de *Araucaria angustifolia* (Bertol) O. Kuntze.

3.4 Criopreservação

Os tratamentos de criopreservação utilizados foram: congelamento rápido, consistindo na imersão direta em NL (Tratamento 1) e resfriamento moderado com pré-resfriamento a -40°C e imersão em NL (Tratamento 2). As cápsulas de ambos os tratamentos permaneceram 120 minutos em NL. Foram utilizadas 80 cápsulas por tratamento. As mesmas foram colocadas em criotubos estéreis, sendo que em cada um foram colocadas cinco cápsulas (FIGURA 5). As testemunhas foram cápsulas contendo os eixos embrionários não criopreservadas.

Para o resfriamento moderado foi utilizado o aparato “Mr. Frosty ® Freezing Container” (marca Nalgene) (FIGURA 6). Neste, a redução da temperatura ocorreu a uma taxa de resfriamento de -1°C por minuto. Após 68 minutos, a temperatura atingiu para -40°C (informação do fabricante). Em seguida, as cápsulas foram imersas em nitrogênio líquido (-196°C) durante 2 horas.



FIGURA 5: Criotubos de 2 mL contendo eixos embrionários de *Araucaria angustifolia* (BERTOL) O. Kuntze encapsulados.



FIGURA 6: Aparato Mr. Frosty® Freezing Container (Nalgene)

3.4.1 Descongelamento e desencapsulamento

Após 120 minutos em NL, os criotubos foram descongelados em banho maria a uma temperatura de 37°C durante três minutos (WALTERS *et al.*,2008). Em seguida, as cápsulas foram colocadas em solução estéril de 100 μ M de KNO₃, para a remoção da cápsula de alginato.

3.5 ANÁLISES FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E MOLECULARES

3.5.1 Integridade do DNA

Para a avaliação do material genético, o DNA total dos eixos embrionários criopreservados foi extraído utilizando-se o protocolo proposto por Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações (ANEXO).

Quinze eixos de cada tratamento, divididos em três porções de cinco, foram utilizados. Realizou-se a quantificação do DNA no aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) e aplicou-se no gel de agarose 0,8% o DNA na concentração de 12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e a eletroforese foi corrida por 30 minutos a 100 W. Foi avaliada a degradação do DNA pela formação de um arraste. O DNA total de eixos não encapsulados (controle), encapsulados e não criopreservados (testemunha), bem como de eixos encapsulados e criopreservados foi analisado.

3.5.2 Germinação *in vitro*

Com o objetivo de avaliar a sobrevivência dos eixos após a criopreservação, os mesmos foram colocados em tubos de ensaio (15 x 2,5 cm) contendo 15 mL de meio de cultura. O meio foi o MS com 4 g L⁻¹ de ágar, 3% de carvão ativado, 0,929 μM de KIN e 11,40 μM de AIA (PRITCHARD e PRENDERGAST, 1986), o pH do meio sendo ajustado para 5,8 antes da autoclavagem por 20 minutos a 120°C. Os tubos foram mantidos em sala climatizada, com temperatura de 25 \pm 2°C sob irradiância de 40 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Foram utilizados 40 eixos por tratamento. Após 15 dias, avaliaram-se a porcentagem de germinação, ocorrência de oxidação e formação de calos. Após 20 dias de cultura *in vitro*, os eixos foram retirados do meio de cultivo para avaliação do seu aspecto morfológico.

3.5.3 Teste de Tetrazólio

Dez eixos embrionários de cada tratamento foram colocados em uma solução de 1% de cloreto de 2, 3, 5 trifênil tetrazólio durante duas horas, a uma temperatura de 30°C e no escuro (ABREU *et al.*, 2012). Após, os eixos foram lavados, avaliados externamente e classificados em viáveis e não viáveis, baseado na sua coloração,

de acordo com o proposto pelas Regras de Análises de Sementes (BRASIL, 2009). Como informação adicional, foi realizado um corte longitudinal nos eixos para verificação da coloração e a viabilidade do eixo embrionário.

3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições de 10 tubos de ensaio por tratamento de criopreservação na germinação *in vitro*. O experimento foi realizado 3 vezes e as médias dos três foram utilizados para as análises estatísticas.

As médias dos tratamentos foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Foi utilizado o programa estatístico Assistat (SILVA e AZEVEDO, 2009).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 GERMINAÇÃO *IN VITRO*

Na germinação *in vitro* somente alguns eixos embrionários encapsulados e não criopreservados germinaram (4%) enquanto os eixos embrionários que foram pré-resfriados e resfriados rapidamente não germinaram (TABELA 1).

Os eixos embrionários da testemunha, mesmo tendo permanecido durante dois dias na solução de osmoproteção com elevada concentração de açúcar e desidratados em fluxo laminar durante 30 minutos, também apresentaram formação de calos e menor nível de oxidação do que o congelamento rápido, mas maior do que os do pré-resfriamento (TABELA 1).

TABELA 01: FORMAÇÃO DE CALO, GERMINAÇÃO E OXIDAÇÃO EM EIXOS EMBRIONÁRIOS DE ARAUCÁRIA APÓS TRATAMENTOS DE CRIOPRESERVAÇÃO (TESTEMUNHA: EIXO ENCAPSULADO E NÃO CRIOPRESERVADO).

Tratamento	Formação de Calos (%)	Germinação (%)	Oxidação (morte negra) (%)	Contaminação (%)
Testemunha	25,00 a	4,00 a	13,00 b	32,50 a
Congelamento rápido	0,00 b	0,00 b	68,57 a	28,93 a
Pré resfriamento	0,00 b	0,00 b	10,80 b	27,25 a

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em alguns eixos encapsulados e não criopreservados ocorreu um intumescimento, início de alongamento, seguido de coloração verde-amarelada, o que indica viabilidade, segundo Walters *et al.* (2008) (FIGURA 7 B). Os eixos que emitiram raiz e a parte aérea alongada com síntese de clorofila (eixos com coloração verde) foram considerados como eixos germinados. Houve também a formação de calos na extremidade superior em 25% dos eixos encapsulados não criopreservados (FIGURA 7 A) (TABELA 1).

A formação de calos, observada em alguns eixos, demonstra haver variabilidade genética entre estes quanto à regeneração *in vitro*, uma vez que as

sementes foram coletadas de diversas matrizes de diferentes procedências. Na literatura, não foram encontrados relatos referentes à capacidade de regeneração *in vitro* de genótipos de araucária de diferentes procedências.

Os eixos encapsulados e congelados rapidamente não apresentaram formação de calos e nem germinação, após 15 dias do cultivo *in vitro*. Além disso, a porcentagem de oxidação foi elevada (68,57%) quando comparada a dos outros tratamentos (TABELA 1) (FIGURA 8 A). A oxidação é o principal dano causado pela criopreservação (GOUVEIA, 2007).

Marin e Duran-Vila (1988), quando criopreservaram embriões somáticos de laranja (*Citrus sinensis*) observaram a ocorrência de oxidação. Os embriões apresentaram uma coloração marrom e não mostraram qualquer desenvolvimento até um período de 34-65 dias após o congelamento em NL. Após este período, alguns embriões desenvolveram manchas verdes que se transformaram em novos embriões, pseudobulbos e calos. Tal fato pode indicar que no presente trabalho os eixos embrionários criopreservados ainda podem estar vivos, mesmo não sendo observado inchaço, alongamento ou mudança de cor. No presente trabalho, essa oxidação se deu no material congelado rapidamente. Com o congelamento rápido do tecido vegetal, não há tempo suficiente para a formação de cristais de gelo que danificam a estrutura celular (MEDEIROS *et al.*, 2004; MEDEIROS e ABREU, 2007; NORMAH e MAKEEN, 2008).

Os eixos embrionários pré-resfriados a -40°C e, em seguida, congelados em NL, não germinaram e além disso não apresentaram formação de calo e nenhum início de coloração ou intumescimento, o que poderia indicar inviabilidade. Estes permaneceram com a aparência inicial após a inoculação *in vitro*. No entanto, a porcentagem de eixos oxidados foi tão baixa quanto àquela encontrada entre os eixos que não foram criopreservados (FIGURA 8 B) (TABELA 1).

Na maioria dos sistemas biológicos, a menor temperatura de super-resfriamento é o ponto de nucleação do gelo, o qual ocorre a cerca de -40°C . Nesta temperatura, as moléculas de água formam “embriões de gelo” de uma dimensão crítica que é termodinamicamente capaz de crescer e formar um cristal (BENSON, 2008). Os cristais de gelo afetam a integridade estrutural e osmótica das células, causando rupturas físicas e danos mecânicos.

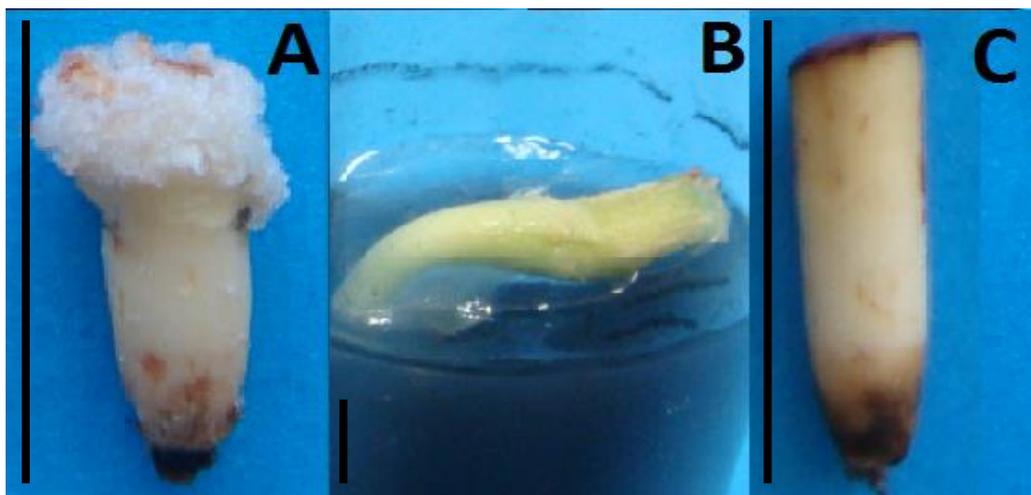


FIGURA 7: Eixos embrionários de *Araucaria angustifolia* (Bertol) O. Kuntze encapsulados e não criopreservados apresentando a formação de calos (A), germinação (B) e oxidação (C) após 15 dias em meio MS com 3% de carvão ativado, 0,929 μM de cinetina e 11,20 μM de ácido indol-acético. Barra (A e C) = 0,5 cm.

Quando uma velocidade controlada de resfriamento é aplicada às células, em primeiro lugar forma-se o gelo extracelular e um gradiente de água diferencial é criado através da membrana celular e intracelular. A água se move para o lado de fora e a quantidade de água disponível para formar cristais de gelo se torna reduzida. Se o resfriamento é muito lento, os solutos das células tornam-se excessivamente concentrados, o que causa danos devido à altas concentrações dos solutos (SANTOS, 1999). Provavelmente, o processo de redução da temperatura para -40°C , na metodologia com pré-congelamento aplicada aos eixos encapsulados, pode ter sido muito lento, o que levou à concentração dos solutos e consequentes danos. Para a definição de uma metodologia adequada para a criopreservação de qualquer tecido vegetal, é necessário adaptar a taxa de resfriamento de modo que apenas a quantidade certa de água seja removida, evitando lesões (WALTERS *et al.*, 2008).

A recuperação dos tecidos criopreservados é uma etapa crítica do processo de criopreservação e depende, entre outros fatores, das condições de cultura subsequentes (WALTERS *et al.*, 2008). Meios enriquecidos com reguladores de crescimento são usualmente utilizados na etapa de crescimento e recuperação de explantes. O meio MS (Murashige e Skoog, 1962) é o mais comumente utilizado (NORMAH e MAKEEN, 2008), porém deve se respeitar a particularidade de cada

espécie e elaborar um protocolo específico de meio de recuperação para tecidos criopreservados. Pritchard e Prendergast (1986) adicionaram 0,929 μM de KIN e 11,20 μM de AIA em meio MS para recuperar embriões de *Araucaria hunsteinii* criopreservados, obtendo uma taxa de sobrevivência de 80% quando os eixos foram desidratados até 20% de umidade.

Na figura 8 estão apresentados os eixos criopreservados pelo método de congelamento rápido e moderado. Os eixos criopreservados pelos dois métodos se apresentaram bastante oxidados (FIGURA 8), apesar de haver grande diferença entre os níveis de oxidação. Pela avaliação dos eixos 15 dias após o cultivo *in vitro* foi observado que a ponta da radícula dos eixos criopreservados pela metodologia com pré-congelamento, apresentou-se mais oxidada. Segundo Walters *et al.* (2008), raízes sem o desenvolvimento de brotos é uma anormalidade comum, especialmente após criopreservação, sugerindo que as células da radícula devem ser mais tolerantes à criopreservação, podendo ainda se recuperarem.

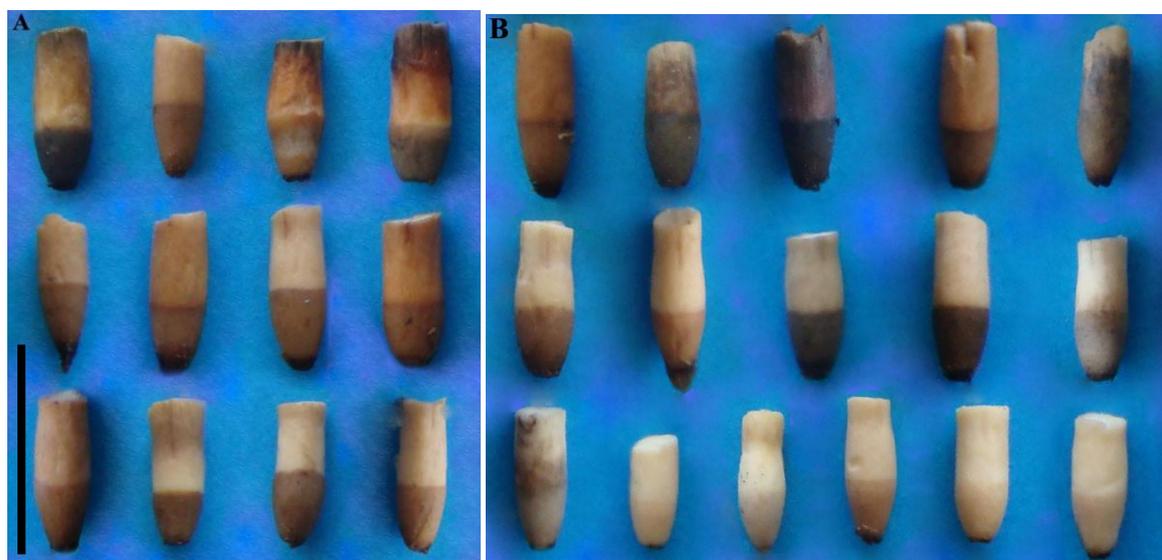


FIGURA 8: Diferentes graus de oxidação dos eixos embrionários de *Araucaria angustifolia* (Bertol) O. Kuntze encapsulados e submetidos ao congelamento rápido (A) e ao pré-resfriamento até -40°C (B) após 20 dias em meio MS com 3% de carvão ativado, 0,929 μM de cinetina e 11,20 μM de ácido indol-acético. Barra = 1 cm.

Gonzalez-Arno (comunicação pessoal) define dois tipos de morte em técnicas de regeneração e criopreservação: a negra e a branca. A morte negra é característica do explante que está oxidado, mas pode se recuperar como relatado por Marin e Duran-Vila (1988) que observaram a regeneração de embriões

somáticos de laranja (*Citrus sinensis*) oxidados. A morte branca ocorre quando o material vegetal, após o descongelamento se apresenta totalmente branco e não pode ser recuperado.

4.2 TESTE DE TETRAZÓLIO

Foi realizado o teste bioquímico de tetrazólio como forma de avaliar a viabilidade dos eixos embrionários encapsulados e criopreservados e em razão de sua rapidez, precisão, baixo custo e possibilidade de estimativa do vigor. Os eixos embrionários foram avaliados internamente. Os resultados estão apresentados na Figura 9, os eixos encapsulados não criopreservados apresentaram coloração vermelha a rosada, o que indicou viabilidade (FIGURA 9 A). O conjunto radícula, hipocótilo e epicótilo apresentaram coloração rosada, enquanto que a parte que circunda este conjunto apresentou coloração vermelha. A maioria dos eixos embrionários que foram criopreservados pelo método de congelamento rápido apresentou o mesmo aspecto dos eixos embrionários não criopreservados, com exceção dos eixos na posição 5 e 10, estes foram considerados não viáveis (FIGURA 9 B).

Os eixos embrionários criopreservados pelo método de pré-resfriamento apresentaram coloração vermelha mais escura quando comparados com os demais (FIGURA 9 C), o que indica o início de deterioração e/ou consequente perda de viabilidade. Em nenhum eixo embrionário submetido aos três tratamentos foi observado flacidez dos tecidos. Vale ressaltar que os eixos encapsulados não criopreservados passaram pela solução de osmoproteção com elevada concentração de sacarose e foram dessecados; ainda assim apresentaram viabilidade.

A imersão direta dos explantes em NL ou resfriamento rápido induz o congelamento intracelular mais cedo no processo, o que evita uma rápida desidratação celular. Segundo Withers e Williams (1998), os cristais de gelo que se formam dentro da célula são muito pequenos e não causam danos (WITHERS e WILLIAMS, 1998). Assim, os eixos embrionários com alto teor de água congelados rapidamente poderiam sobreviver após a criopreservação (NORMAH e MAKEEN, 2008). Berjak *et al.* (1999) conseguiram uma recuperação importante de plântulas a

partir dos eixos embrionários de sementes recalcitrantes de *Quercus robur* (60%), que foram congeladas rapidamente. No resfriamento lento, o gelo se forma externamente à célula, mas a membrana celular funciona como uma barreira que evita a nucleação de gelo no seu interior, deixando o conteúdo celular posteriormente gelado. A água sai por difusão da célula ao meio extracelular e o conteúdo celular é desidratado; este se solidifica com a formação de uma pequena quantidade de gelo que não causa danos (WITHERS e WILLIAMS, 1998).

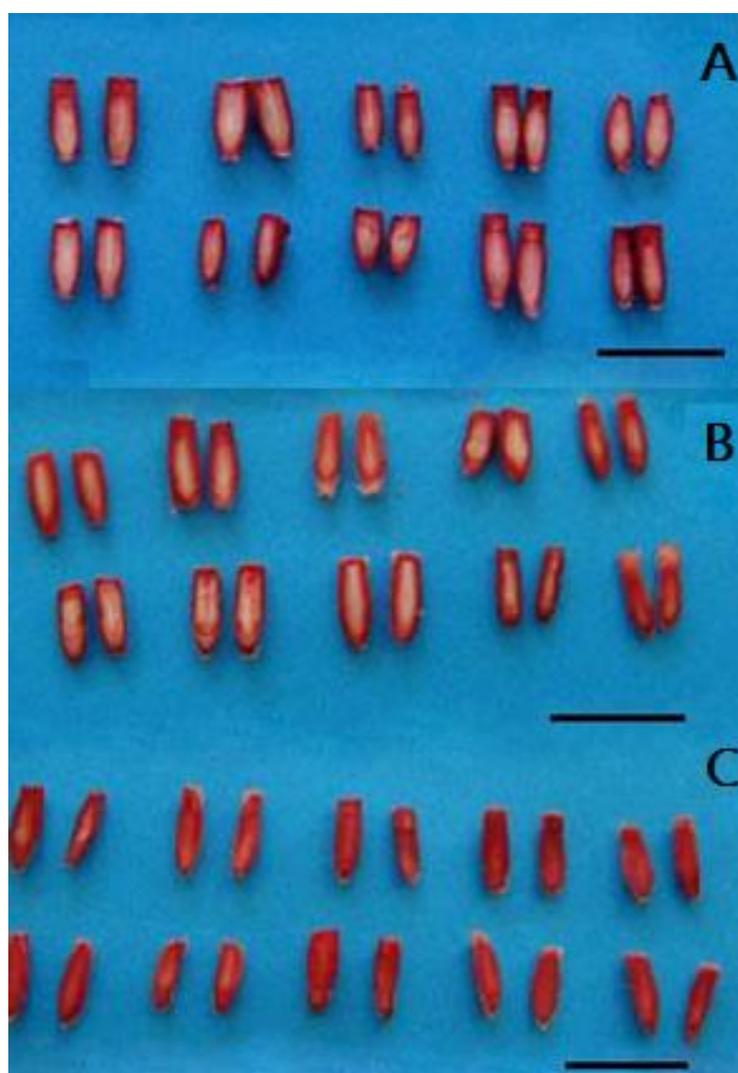


FIGURA 9: Eixos embrionários de *Araucaria angustifolia* (Bertol) O. Kuntze avaliados pelo teste de tetrazólio. A: eixos encapsulados e não criopreservados; B: eixos criopreservados pelo método rápido; C: eixos criopreservados com pré-congelamento. (Barra = 1cm).

Como foram notadas diferenças entre as colorações externa e interna nos eixos quando submetidos à criopreservação, o desenvolvimento de um protocolo adequado para o teste de tetrazólio seria útil, uma vez que esta é a forma mais rápida de se conhecer a viabilidade dos eixos.

4.3 INTEGRIDADE DO DNA

Na FIGURA 10 está apresentado o perfil eletroforético do DNA total extraído dos eixos embrionários de araucária não encapsulados, encapsulados não criopreservados e criopreservados. Pode ser observada a integridade do DNA total de todos os eixos analisados, não havendo arrastes no perfil eletroforético de cada amostra. Tal fato indica que o encapsulamento, osmoproteção, rápida secagem em fluxo laminar e criopreservação não causaram danos ao material genético dos eixos embrionários de araucária.

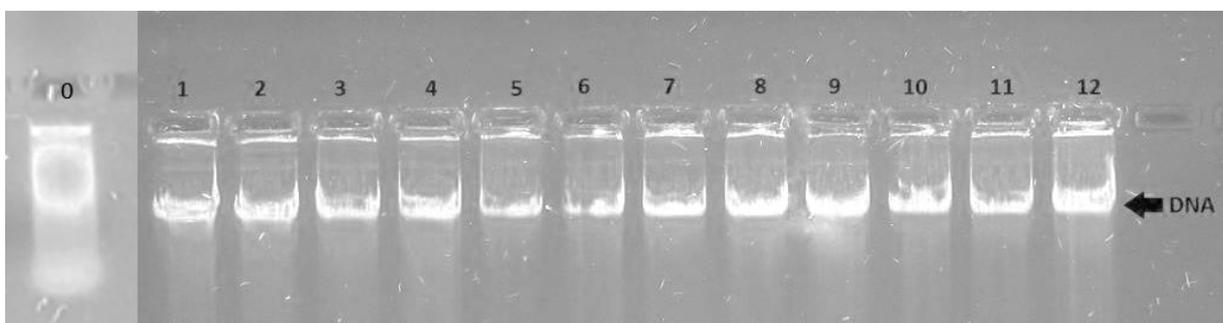


FIGURA 10: Perfil eletroforético do DNA total extraído de eixos embrionários de *Araucaria angustifolia* (Bertol) O. Kuntze. 0: DNA degradado. 1, 5 e 9: eixos excisados antes da montagem dos testes; 2, 3 e 4: eixos encapsulados após a osmoproteção; 6, 7, e 8: eixos encapsulados submetidos ao congelamento rápido; 10, 11, 12 eixos encapsulados submetidos ao congelamento moderado.

Foi realizada a extração de DNA de eixos embrionários retirados das sementes antes do procedimento de encapsulamento (amostras 1, 5 e 9) (FIGURA 10). Tal procedimento foi adotado devido ao fato de que a solução de alginato de sódio e a solução com elevada concentração de sacarose poderiam ter causado algum efeito tóxico nos eixos. Como houve uma etapa de desidratação das cápsulas, o DNA total de eixos encapsulados e deixados em desidratação em

câmara de fluxo laminar, também foi extraído (amostras 2, 3 e 4). Neste último caso objetivou-se avaliar se a rápida secagem e o tratamento de osmoproteção poderiam ter causado danos ao DNA.

A qualidade genética pode ser afetada pela ocorrência de degradação do ácido desoxirribonucleico (DNA) devido ao estresse gerado pela desidratação, mudança do estado da água, toxidez das soluções crioprotetoras e pelas baixas temperaturas utilizadas na criopreservação.

Masetto *et al.* (2008), avaliando o comportamento de sementes de *Eugenia pleurantha* frente a desidratação, utilizaram o perfil eletroforético de DNA total para verificar a degradação do mesmo, sendo, o DNA total extraído após cada etapa de redução da quantidade de água presente nas sementes. No presente trabalho, como a criopreservação está relacionada à mudança de estado da água, e o grau de hidratação dos tecidos também é afetado, podendo levar à desnaturação das moléculas de DNA, a observação do perfil eletroforético do DNA total foi aplicada.

Analisando a formação de bandas sem arraste em todos os tratamentos, observou-se que o DNA total dos eixos embrionários criopreservados pelos dois métodos utilizados permaneceu íntegro, não apresentando diferenças entre si. Mantida a integridade do material genético após a criopreservação, é esperado que ocorra a germinação dos eixos e a obtenção de plântulas normais.

Uma das técnicas mais utilizadas em espécies com características recalcitrantes é encapsular os embriões e fazer um pré-cultivo com altas concentrações de sacarose levando a desidratação do material vegetal, removendo a maior parte ou toda a água congelável. A vitrificação dos solutos internos ocorre durante a exposição ao NL, assim podendo evitar a cristalização do gelo intracelular e a morte dos tecidos (ENGELMANN *et al.*, 2008). A maioria dos trabalhos envolvendo encapsulamento e desidratação de espécies classificadas como recalcitrantes e intermediárias obtiveram sucesso. Por exemplo Wang *et al.* (2005) criopreservaram brotos de framboesa (*Rubus idaeus* L.) utilizando técnicas de encapsulamento e vitrificação e encapsulamento-desidratação, sendo que grande quantidade de células meristemáticas sobreviveram ao nitrogênio líquido.

Fernandes *et al.* (2008) criopreservaram embriões somáticos de *Quercus suber* L. encapsulados e realizaram pré-cultura de 3 dias em sacarose 0,7 M e subsequente secagem até 25 ou 35% de água, seguido por congelamento em NL.

Não houve diferenças morfológicas entre os embriões somáticos desidratados a 25 e 35%, sendo a viabilidade e a sobrevivência em longo prazo altas.

A aplicação de soluções crioprotetoras contendo glicerol ou propanodiol pode melhorar as porcentagens de recuperação sob condições *in vitro* e reduzir a taxa de resfriamento, mas estes compostos podem ter efeitos tóxicos, dependendo das espécies e tempos de exposição (WALTERS *et al.*, 2008). Outras soluções crioprotetoras podem ser utilizadas como sacarose, etileno glicol, DMSO entre outros.

Reguladores vegetais também podem ser utilizados. Por exemplo, plúmulas de *Cocos nucifera* L. foram encapsuladas e criopreservadas, após o pré-tratamento com diferentes combinações de soluções de crioproteção, sacarose e ABA (Bandupriya *et al.*, 2007). Com a adição de ABA, a taxa de recuperação do material vegetal aumentou em cerca de 60%. No presente trabalho, foi testada a utilização de ABA (10, 20 e 40 μ M) na solução de osmoproteção em eixos encapsulados de araucária (dados não mostrados) e mediante testes de germinação *in vitro* e estudo de qualidade do DNA, foi comprovada a morte do material vegetal. Assim, o uso de uma solução contendo alta concentração de sacarose (7M) para a pré-cultura dos eixos foi utilizada.

A sacarose, quando infiltrada nos tecidos, ajuda a manter a sua viabilidade durante a desidratação e o congelamento, estabilizando as membranas celulares. Além disso, mediante a substituição de água, mantém os fosfolipídios da membrana na fase líquida cristalina e promove a formação do estado vítreo no citoplasma (BANDUPRIYA *et al.*, 2007). Paul *et al.* (2000) testaram diversos açúcares em soluções crioprotetoras de brotos de macieira encapsulados e desidratados, mas a sacarose e o sorbitol apresentaram um melhor efeito crioprotetor.

Outro fator crucial na criopreservação é o descongelamento. Neste trabalho, as amostras foram descongeladas em banho Maria a 37°C durante 3 minutos, seguindo o protocolo de Walters *et al.* (2008). É imperativo que o descongelamento ocorra rapidamente para evitar o crescimento de cristais de gelo. O método de descongelamento e o meio utilizado para este e para a reidratação, parecem ser fatores críticos na criopreservação. O mesmo autor relata que, na técnica de encapsulamento e desidratação, o reaquecimento das amostras pode ocorrer lentamente à temperatura ambiente desde que as amostras sejam tratadas antes do

congelamento; assim, não há nenhum risco da recristalização do gelo durante o aquecimento (WALTERS et al., 2008).

Ajustar a velocidade de descongelamento das cápsulas contendo os eixos de araucária é uma alternativa. Scottez *et al.* (1992) encapsularam, desidrataram em fluxo de ar e criopreservaram brotos de pereira (*Pyrus communis* L cv Beurré Hardy) e os brotos foram reaquecidos lentamente em temperatura ambiente e transferidos para meio de cultura sólido e, após uma semana, foi retirada a cápsula e feito subcultura em meio fresco. Os melhores resultados de recuperação (80%) foram obtidos usando 0,75 M de sacarose para pré-cultivo e 4 h de desidratação, com 20% de água residual. Provavelmente, o reaquecimento a temperatura ambiente do material criopreservado pode ser uma alternativa na definição de um protocolo.

A recuperação dos tecidos que foram criopreservados depende tanto do descongelamento e dos procedimentos de reidratação, como das condições de cultura subsequentes (WALTERS *et al.*, 2008). É particularmente importante que os explantes criopreservados produzam plantas idênticas aos seus genótipos não tratados. O aperfeiçoamento do meio para o crescimento e recuperação é imprescindível para o sucesso de um protocolo de criopreservação. Pritchard e Prendergast (1986) adicionaram 0,929 μM L de KIN e 11,20 μM L de AIA em meio MS para recuperar embriões de *Araucaria hunsteinii* criopreservados, obtendo uma taxa de 80% de sobrevivência quando os eixos foram desidratados até 20% de umidade.

Lardet *et al.* (2007) criopreservaram calos friáveis de *Hevea brasiliensis* e observaram que a redução da concentração de CaCl_2 do meio de pré-cultura antes da criopreservação promoveu o crescimento do calo após o descongelamento. A diminuição da concentração de CaCl_2 nesse meio levou a uma queda no teor de cálcio do calo, indicando uma ligação direta entre a concentração de CaCl_2 do meio de pré-cultura e o teor de cálcio endógeno dos calos (LARDET et al., 2007). No presente trabalho ocorreu uma elevada porcentagem de formação de calos dos explantes. A fase de calo antes da formação da planta completa é indesejável, pois calos podem aumentar a frequência de aparecimento de variantes genéticas (WALTERS et al., 2008). A redução na quantidade de CaCl_2 e de auxinas no meio de cultura de crescimento dos explantes criopreservados poderá diminuir a formação de calos.

Outra alternativa possível para otimizar método de criopreservação de eixos embrionários de araucária é a utilização de uma solução de descongelamento e de rehidratação contendo $1 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} e $1 \mu\text{M}$ de Mg^{2+} (PERÁN *et al.*, 2004). Esta solução promove a formação de plântulas normais, enquanto a imersão direta em NL facilita a melhor recuperação do que o equilíbrio de hidratação dos explantes parcialmente desidratados, a adição de cálcio e magnésio na solução crioprotetora e combinação com antioxidantes podem reduzir o estresse oxidativo durante a recuperação (WALTERS *et al.*, 2008). O cálcio desempenha um papel importante na criotolerância, mediante seu envolvimento na preservação da integridade da membrana. O cálcio é conhecido por estimular a desintoxicação de mecanismos celulares, desencadeando a atividade da catalase e os limites do fenômeno de peroxidação lipídica pela manutenção de um elevado nível intracelular de glutathione, assim prevenindo os danos às membranas celulares (LARDET *et al.*, 2007). Pode ser realizada a reidratação em meio de cultura líquido, Perán *et al.* (2004) estudaram a influência da técnica de hidratação em embriões de três espécies recalcitrantes (*Artocarpus heterophyllus*, *Podocarpus enkelii* e *Ekebergia capensis*) em três formas de rehidratação diferentes: a rápida, por imersão completa e direta do material vegetal, a intermediária, na qual as amostras são colocadas em local úmido, mas não molhado (sem água líquida livre) e a lenta, por exposição a uma atmosfera saturada várias horas, suspendendo os tecidos sobre uma malha sobre a água num recipiente fechado forrado com papel filtro umedecido. Adicionalmente, os eixos embrionários de *Ekebergia capensis* foram reidratados rapidamente numa solução contendo $1 \mu\text{M}$ de CaCl_2 e $1 \mu\text{M}$ de MgCl_2 (solução de Ca/Mg). Independente do método de rehidratação, esse procedimento forneceu uma melhor porcentagem de germinação. Sendo assim, a utilização do método de rehidratação pode auxiliar na sobrevivência do material vegetal (PERÁN *et al.*, 2004).

Reed e Uchendu (2008) indicaram outra alternativa para aumentar a tolerância ao congelamento (resistência ao frio) em algumas espécies temperadas e subtropicais: a exposição de plantas a temperaturas baixas. Este processo é denominado aclimatação ao frio ou rustificação. A aclimatação ao frio também é muito eficaz na melhoria da rebrota de plantas criopreservadas, de clima temperado e subtropical. A aclimatação ao frio provavelmente ativa os genes que atuam na tolerância das plantas a baixas temperaturas, melhorando a estabilidade da

membrana (KACZMARCZYK, 2012). Este método pode ser utilizado com a espécie *Araucaria angustifolia*, uma vez que é uma planta subtropical.

Niino e Sakai (1992) criopreservaram ápices de macieira (*Malus domestica* Borkh cv. Fuji) utilizando o encapsulamento e a desidratação combinados com a aclimação ao frio. No início, as brotações ficaram em uma temperatura de 5 °C por três semanas e foram progressivamente pré-cultivados em meio MS com concentrações crescentes de sacarose (0,1, 0,4 e 0,7M) a 5 °C. Em seguida, os brotos foram encapsulados e pré-cultivados em meio suplementado com sacarose 1,0 M durante 16 h a 5 °C e desidratados até cerca de 33% de conteúdo de água (base de peso fresco) em sílica gel estéril a 25 °C antes de ser imersos em NL. A taxa média de formação de brotos após o aquecimento foi de cerca de 80%. É possível que uma aclimação ao frio seguida de pré-cultivo com diferentes concentrações de açúcares no meio de crescimento melhore a tolerância de ápices ou brotações de *Araucaria angustifolia*.

Outra alternativa a ser testada no método de criopreservação de araucária é o pré-condicionamento, em que a sacarose ou outras substâncias osmoticamente ativas são geralmente incorporadas ao meio de crescimento. A sacarose pode melhorar a tolerância das plantas ao frio pela acumulação nas células e no aumento da tolerância osmótica. Foi mostrado repetidamente em pré-condicionamento para a técnica de encapsulamento e desidratação (REED e UCHENDU, 2008). Panis et al. (1996) pré cultivaram meristemas de banana (*Musa* spp.) em meio MS enriquecido com 0,3 – 0,5 M de sacarose antes do congelamento rápido, resultando em diversas taxas de viabilidade, dependendo da cultivar. Martinez *et al.* (1999) também pré-cultivaram meristemas de *Olea europaea* L. var. Arbequina em meio de cultura com 0,75 M de sacarose, e, em seguida, o material foi desidratado e criopreservado, com até 72% de sobrevivência.

Sakai *et al.* (2008) relataram que, em algumas plantas tropicais, o pré-condicionamento de meristemas crescidos em meio solidificado enriquecido com sacarose foi muito importante no aumento da regeneração após a criopreservação. Assim, o pré-condicionamento é um passo adicional promissor para ser incluído no processo de vitrificação de algumas plantas tropicais.

Avaliar e compreender as etapas de desenvolvimento das sementes, pode ser pertinente para o sucesso da criopreservação. Por exemplo, a criopreservação de sementes imaturas ou em germinação (radícula protuberante) é difícil. A

criopreservação é mais difícil em eixos embrionários contendo mais que 2,0 g H₂O/g MS, avaliar a tolerância à dessecação do eixo embrionário é importante. Avaliações definitivas de sobrevivência exigem um ensaio de germinação que pode levar semanas ou meses (WALTERS *et al.*, 2008).

Para um protocolo de criopreservação de sucesso, os embriões excisados e eixos embrionários devem estar em um estado fisiológico e de desenvolvimento adequado para a aquisição de tolerância à dessecação e congelamento, com a capacidade de gerar plântulas vigorosas após o armazenamento criogênico (NORMAH e MAKEEN, 2008). Outros métodos de criopreservação foram testados (dados não publicados) para a conservação de eixos embrionários de araucária, porém a técnica de encapsulamento e desidratação mostrou-se mais promissora para a crioconservação. Água como um solvente biológico é altamente influente na determinação da sobrevivência após a exposição ao NL, assim, a remoção da água é necessária para evitar a formação de cristais de gelo.

No encapsulamento, quando combinado com o congelamento rápido, os explantes podem ter maior sobrevivência após a criopreservação quando possuem teores de água moderada a alta. Desta forma, o encapsulamento e desidratação são uma alternativa para a criopreservação de material vegetal de espécies de origem tropical (ENGELMANN *et al.*, 2008).

Essas são algumas alternativas substanciais para o aprimoramento da técnica de armazenamento a temperaturas ultra baixas (-196°C) de espécies recalcitrantes como a araucária.

Pelos resultados obtidos no presente trabalho pode-se dizer que uma metodologia para a criopreservação de eixos embrionários de araucária ainda não pode ser definida. A criopreservação dos eixos embrionários de araucária pelo congelamento rápido parece ser mais indicada que pelo congelamento moderado, pois apesar de não ter ocorrido a germinação de nenhum embrião, o DNA total se apresentou íntegro e o teste do tetrazólio demonstrou viabilidade dos eixos embrionários.

5 CONCLUSÃO

- O encapsulamento não causa danos em eixos embrionários de *Araucaria angustifolia* Bertol O. Kuntze.
- Os métodos testados causaram oxidação dos eixos embrionários.
- O resfriamento rápido é o mais promissor dos métodos testados.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi o início de um processo de estabelecimento de um protocolo de criopreservação de sementes de *Araucaria angustifolia*.

Diversos trabalhos de criopreservação para espécies recalcitrantes têm utilizado o encapsulamento e a desidratação, uma vez que a cápsula oferece uma melhor proteção do material vegetal a ser criopreservado. Há diversas etapas que podem ser adicionadas para o sucesso da conservação a baixas temperaturas de araucária. Por exemplo, definir a maturidade do material vegetal, realizar uma pré-cultura dos eixos ou um pré-condicionamento, utilizar outros tipos de açúcares como trealose, glucose, entre outros, adequar a taxa de descongelamento, realizar rehidratação do material e estabelecer um meio de cultura adequado para o crescimento dos explantes criopreservados. Também poderá ser testado outros tipos de explantes, como ápices e meristemas.

Não existe um único fator que determine o sucesso da criopreservação, mas sim uma combinação de técnicas, reagentes e tempos de exposição que podem ser utilizados. Assim, ainda há necessidade de mais estudos em relação à conservação de espécies recalcitrantes como *Araucária angustifolia* sob baixas temperaturas (-196°C).

REFERENCIAS

ABREU, D. C. A. ; MEDEIROS, A. C. de S. ; AGUIAR, I. B. ; BANZATTO, D. A. Teste Topográfico de tetrazólio em sementes de pinheiro-brasileiro (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze). In: 4. Congresso Florestal Paranaense, 2012, Curitiba. 4. Congresso Florestal Paranaense, 2012.

ALARCON, G. G.; DA-RÉ, M. A.; FUKAHORI, S. T. I.; ZANELLA, L. R. Fragmentação da Floresta com Araucária e ecossistemas associados no Corredor Ecológico Chapecó, Santa Catarina. **Biotemas**, v. 24, n. 3, p. 25-38, 2011.

ANSELMINI, J. I.; **Fenologia reprodutiva da *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. Ktze, na região de Curitiba – PR.** Curitiba, 62 F. Dissertação (Mestrado em Agronomia Produção Vegetal), Universidade Federal do Paraná. 2005.

ASSY-BAH, B.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of mature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L) and subsequent regeneration of plantlets. **Cryo-Letters**. v. 13, p. 117-126, 1992.

BANDUPRIYA, H. D. D.; FERNANDO, S.C.; VERDEIL, J.L.; MALAURIE, B. Effect of Abscisic Acid on survival and recovery of cryopreserved plumule explants of Coconut (*Cocos nucifera* L.). **Cocos Sri Lanka Journals on line**, v. 18, p 58-66, 2007.

BECKETT, R.P.; MINIBAYEVA, F.; Wounding induces a burst of extracellular superoxide production in *Peltigera canina*. **Lichenologist**. v.35, p. 87-89, 2003.

BECKETT, R.P.; MINIBAYEVA, F.V.; LAUFER, Z.; Extracellular reactive oxygen species production by lichens. **Lichenologist**. v. 37, p.397-407, 2005.

BECKETT, R.P.; MINIBAYEVA, F.V.; LÜTHJE, S.; BÖTTGER, M. Reactive oxygen species metabolism in desiccation-stressed thalli of the liverwort *Dumortiera hirsuta*. **Physiologia Plantarum**. v.122, p. 3-10, 2004.

BECKETT, R.P.; MINIBAYEVA, F.V.; VYLEGZHANINA, N.N.; TOLPYSHEVA, T.; High rates of extracellular superoxide production by lichens in the suborder Peltigerineae correlate with indices of high metabolic activity. **Plant Cell and Environment**. v.26, p. 1827- 1837, 2003.

BENSON, E.E.; **Cryopreservation Theory**. In: REED, B. M. (Ed.) Plant Cryopreservation- A Practical Guide. New York, USA: Springer. p.15-32. 2008.

BERJAK P.; WALKER M.; WATT M.P.; MYCOCK D.J.; Experimental parameters underlying failure or success in plant germplasm cryopreservation: a case study on zygotic axes of *Quercus robur* L. **CryoLetters**. v. 20, p. 251–262, 1999.

BERJAK, P.; BARTELS, P.; BENSON, E.E.; HARDING, K.; MYCOCK, D.J.; PAMMENTER, N.W.; WESLEY-SMITH, S.J. Cryoconservation of South African plant genetic diversity. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 47, p. 65-81, 2011.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W. Seeds recalcitrance – current perspectives. **South African Journal of Botany**, n. 67, p. 79-89, 2001.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W.; From Avicennia to Zizania: seed recalcitrance in perspective. **Annals of Botany**, v. 101, p. 213 – 228, 2008.

BITTENCOURT, J.V.M. **Genetic diversity and dynamics in remnant patches of *Araucaria angustifolia* Forest in Paraná State, Brazil; implications for conservation and restoration**. Tese (Doutorado em Filosofia) – The University of Reading, Berkshire, Reino Unido. 2007.

BONJOVANI, M. R.; BARBEDO C.; Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. Subsp. *Affinis* (DV) T.D. Penn. Toleram temperatura sub-zero. **Revista Brasileira de Botânica**. v.31, n.2, p.345-356, abr.-jun. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária**. Brasília, DF: Mapa/ACS, 399p. 2009.

CARNEIRO, C.S.; CAL-VIDAL, J.; Estruturação de cristais de gelo em soluções aquosas contendo solutos diversos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.2, p.423-432, fevereiro, 2000.

CARVALHO, L. R. De.; SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A.C.; Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, nº 2, p.15-25, 2006a.

CARVALHO, M. L. M.; VON PINHO, E.V.R.; Armazenamento de sementes. **Lavras:UFLA/FAEPE**, pg. 15 -16. 2000b.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4. ed. Jaboticabal: **FUNEP**, 588 p. 2000a.

CARVALHO, P. E. R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira. Brasília: **EMBRAPA-SPI**, p.640 1994.

CARVALHO, P. E. R.; Pinheiro-do-Paraná. Circular técnica 60 **EMBRAPA Florestas**. Colombo PR p.17. 2002.

CARVALHO, V. S.; **Criopreservação de sementes e pólen de orquídeas**. Tese de doutorado do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia. Universidade Federal de Lavras. Viçosa, Janeiro de 2006.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS,E.H. Effect of temperature and moisture content on the germination of papaya seeds. **Seed Science Research**, v.1, n.1, p.69-72,1991.

ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v. 112, p.9-18, 1997.

ENGELMANN, F. In vitro conservation of tropical plant germplasm - a review. **Euphytica**, v. 57, p. 227-243, 1991.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular and Developmental Biology,Plant** v. 40, p. 427-433, 2004.

ENGELMANN, F.; ARNAO, M. T. G.; WU, Y.; ESCOBAR, R.; **The Development of Encapsulation Dehydration**. In: REED, B. M. (Ed.) Plant Cryopreservation- A Pratical Guide. Nova York EUA. Springer, p. 59-68. 2008.

ENGELMANN, F; Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources, In: Engelmann, F. and Takagi, (eds.) Cryopreservation of tropical

plant germplasm. Current research progress and application. Japan International. **Center for Agricultural Sciences, Japan and International Plant Genetic Resources Institute**; Roma, Italy, p. 8-20. 2000.

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

FERNANDES, P.; RODRIGUEZ, E.; PINTO, G.; ROLDÁN-RUIZ, I.; LOOSE, M.; SANTOS, C.; Cryopreservation of *Quercus suber* somatic embryos by encapsulation-dehydration and evaluation of genetic stability. **Tree Physiology** v. 28, p. 1841–1850, 2008.

FERRI, M. G.; Botânica: Morfologia Externa das Plantas. 15ª ed. São Paulo: **Nobel**, 148 p. 1983.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture.** 2. ed. Exegetic: Edington, 547p. vol 1. 1993.

GONZAGA, T. W. C.; MATA, M. E. R. M. C.; SILVA, H.; DUARTE, M. E. M.; 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.

GOUVEIA, M. J. T.; The effect of developmental status and excision injury on the success of cryopreservation of germplasm from non-orthodox seeds. **School of Biological and Conservation Sciences.** University of KwaZulu-Natal Durban. 2007.

GUERRA, M. P; POMPELLI, M. F; Conservação de germoplasma *in vitro*. **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA.** Disponível em: <http://www.lfdgv.ufsc.br/CONSERVAINVITRO.pdf>

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. **Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas.** In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; Buso, J.A. (eds.). Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília, Embrapa-CBAB. v.2. p. 533-568. 1999.

HIRSH A. G.; Vitrification in plants as a natural form of cryoprotection. **Cryobiology** v. 24, p. 214-228, 1987.

KACZMARCZYK, A.; FUNNEKOTTER, B.; MENON, A.; PHANG, P. Y.; AL-HANBALI, A.; BUNN, E.; MANCERA, R. L. **Current Issues in Plant Cryopreservation**. In: KATKOV, I. (Ed.), ISBN: 978-953-51-0191-8, InTech, p. 417-438, 2012.

KAMI, D. **Cryopreservation of Plant Genetic Resources**. In: KATKOV, I. (Ed.) Current Frontiers in Cryobiology. ISBN: 978-953-51-0191-8, InTech, p. 439 – 456. 2012.

KOCH, Z.; CORRÊA, M. C. **Araucária: A Floresta do Brasil Meridional**. Curitiba, Olhar Brasileiro, 148 p. 2002.

LARDET, L.; MARTIN, F.; DESSAILLY, F.; CARRON, M.; MONTORO, P. Effect of exogenous calcium on post-thaw growth recovery and subsequent plant regeneration of cryopreserved embryogenic calli of *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). **Plant Cell Reports**, v. 26. p.559–569, 2007.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, P. C.; REIS, M. S.; Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n.4, p. 787 – 796, out. – dez., 2004.

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

MARTINEZ, D.; ARROYO-GARCIA, R.; REVILLA, M. A.; Cryopreservation of in vitro grown shoot-tips of *Olea europaea* L var Arbequina. **Cryo Letters**. v. 20 p. 29-36. 1999.

MARTÍNEZ, M. T.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A. M.; Cryopreservation of embryogenic cultures of *Quercus robur* using desiccation and vitrification procedures. **Cryobiology** v. 46 p.182–189, 2003.

MARTINS, L.; LAGO, A. A.; ANDRADE, A. C. S.; SALES, W. R. M.; Conservação de sementes de Ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl.) em NL. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, nº 2, p.071-076, 2009.

MASETTO, T. E.; FARIA, J.M.R.; DAVIDE, E. A. A. S.; Desiccation tolerance and dna integrity in *Eugenia pleurantha* O. Berg. (Myrtaceae) seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, nº 1, p.175-180, 2008.

MATSUMOTO, T.; MOCHIDA, K.; ITAMURA, H.; SAKAI, A.; Cryopreservation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) by vitrification of dormant shoot tips. **Plant Cell Rep** v. 20 p.398–402. 2001.

MATSUMOTO, T.; SAKAI, A.; YAMADA, K. Cryopreservation of in vitro grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. **Plant Cell Reports**, v. 13, p.442–446 1994.

MAZUR M. L.; Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. **The Journal of General Physiology**. v. 47 p. 347-369 1963.

MEDEIROS, A. C. S.; CAVALLARI, D. A. N.; Conservação de germoplasma de aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engl. I. germinação de sementes após imersão em NL (-196°C). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 14, nº 1, p. 73-75, 1992.

MEDEIROS, A.C.S.; ABREU, D. C.A. Desidratação ultra-rápida de embriões. **Pesquisa Florestal Brasileira**. Colombo, n.54, p.119-125, jan./jun. 2007.

MEDEIROS. A.C.S.; WALTERS, C.; HILL, L. Sensibilidade de embriões do pinheiro-brasileiro (*Araucaria angustifolia*) à desidratação e baixa temperatura. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 48, p. 129-137, 2004.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497, 1962.

NIINO, T.; SAKAI, A.; Cryopreservation of alginate-coated in vitro-grown shoot tips of apple, pear and mulberry. **Plant Science**. v. 87 p. 199–206. 1992.

NORMAH, M. N.; MAKEEN, A.M.; **Cryopreservation of Excised Embryos and Embryonic Axes**. In: REED, B. M. (Ed.) *Plant Cryopreservation- A Practical Guide*. New York, USA: Springer, p. 211 – 240. 2008.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P.; Aspects of recalcitrant seed physiology. In: **VII Brazilian Plant Physiology Congress**. In the Coordinated Session on Seed Physiology. Brasília, July 1999b.

PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research** v.9, p.13-37, 1999a.

PANIS, B.; TOTTE, N.; VANNIMMEN, K.; WITHERS, L.A.; SWENNEN, R.; Cryopreservation of banana (*Musa* spp) meristem cultures after preculture on sucrose. **Plant Science**, v. 121 p. 95-106. 1996.

PAUL, H.; DAIGNY, G.; SANGWAN-NORREEL. Cryopreservation of apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoot tips following encapsulation-dehydration or encapsulation-vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 19 p. 768-774 2000.

PAULET F; ENGELMANN F; GLANZMANN J.C. Cryopreservation of apices of in vitro plantlets of sugarcane (*Saccharum* sp.) hybrids using encapsulation-dehydration. **Plant Cell Reports** v. 12 p. 525-529 1993.

PERÁN, R.; PAMMENTER, N.W.; NAICKER, J.; BERJAK, P.; The influence of rehydration technique on the response of recalcitrant seed embryos to desiccation. **Seed Science Research**, v. 14, p.179 -184 2004.

PIRES, P. P.; **Sazonalidade e soluções nutritivas na miniestaquia de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. em propágulos de origem seminal.** Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. 2012.

PRITCHARD, H.W.; PRENDERGAST, F.G. Effects of desiccation and cryopreservation on the in vitro viability of embryos of the recalcitrant seed species *Araucaria hunsteinii* K. Schum. **Journal of Experimental Botany**, v. 37, n. 182, p. 1388-1397, 1986.

REDENBAUGH, K., B.; PAASCH, J.; NICHOL, M.; KOSSLER, P.; WALKER, K.; Somatic seeds: encapsulation of asexual embryos. **Biology technology**. v. 4 p. 797-801, 1986.

REED, B. M.; UCHENDU, E. **Controlled Rate Cooling**. In: REED, B. M. (Ed.) Plant Cryopreservation- A Practical Guide. New York, USA: Springer, p.77- 92, 2008.

REITZ, P. R.; KLEIN, R. M.,; Araucariáceas. **Flora Ilustrada Catarinense**. Herbário Barbosa Rodrigues. Itajaí Santa Catarina Brasil. 62 p. 1966.

ROBERTS, E.H.; Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v.1 n.3, p. 499-514, 1973.

ROCA, W. M.; ARIAS, D. I.; CHÁVEZ, R. Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en La agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, p. 697-713. 1991.

Royal Botanic Gardens Kew. **Seed Information Database (SID)**. Version 7.1. 2008.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. **Cryoletters** v. 28, p. 151-172, 2007.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I.;. Cryopreservation of nucellar cells of naval orange (*Citrus sinensis* var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Rep.**, v. 9, p. 30-33, 1990.

SAKAI, A; HIRAI, D.; NIINO, T.; **Development of PVS-Based Vitrification and Encapsulation–Vitrification Protocols**. In: REED, B. M. (Ed.) *Plant Cryopreservation- A Pratical Guide*. New York, USA: Springer, p 33-57. 2008.

SANCHEZ, C.; MARTINEZ, M.T.; VIDAL, N.; SAN JOSÉ, M.C.; VALLADARES, S.; VIEIEZ, A.M. Preservation of *Quercus robur* germplasm by cryostorage of embryogenic cultures derived from mature trees and RAPD analysis of genetic stability. **CryoLetters**, v. 29, n. 6, p. 493 – 504, 2008.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de eixos embrionários de espécies de Citrus usando encapsulamento e desidratação. **Documentos 115**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 23p. 2004.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal: A alternativa para a conservação a longo prazo. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento** - nº 20 - maio/junho 2001.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. VII **Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal**, Brasília, DF. Julho, 1999.

SANTOS, I. R. I. Manual de Curadores de Germoplasma – Vegetal: Criopreservação. **Documentos 319**. Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia. Julho , 2010.

SCOTTEZ C.;CHEVREAU E., GODARD N.; ARNAUD Y., DURON M.; DEREUDDRE J.; Cryopreservation of cold-acclimated shoot tips of pear *in vitro* cultures after encapsulation-dehydration. **Cryobiology** v. 29 p.691-700. 1992.

SILVA, F. A. A; AZEVEDO, C. A. V. Principal Components Analysis in the Software Assisat-Statistical Attendance. In: **Word Congress on Computers in Agriculture**, Reno- NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SOUSA, V. A.; AGUIAR, A.; V.; Programa de melhoramento genético de araucária da Embrapa Florestas: situação atual e perspectivas. **Documento 237**. Colombo, PR, 2012.

SOUSA, V. A.; HATTEMER, H. H.; Fenologia reprodutiva da *Araucaria angustifolia* no Brasil. **Boletim Pesquisa Florestal**. Colombo PR. n. 47, p. 19-32, jul/dez. 2003.

WALTERS, C.; WESLEY-SMITH, J.; CRANE, J.; HILL, L. M.; CHMIELARZ, P.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK P.; **Cryopreservation of Recalcitrant (i.e. Desiccation-Sensitive) Seeds**. In: REED, B. M. (Ed.) *Plant Cryopreservation- A Practical Guide*. Nova York, EUA. Springer, p. 465- 484. 2008.

WANG, Q;; LAAMANEM, L.; UOSUKAINEN, M;; VALKONEM, J. P.T.; Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation–vitrification and encapsulation–dehydration. **Plant Cell Reports**. v. 24 p. 280-288. Julho 2005.

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

ZELIANG, P. K.; PATTANAYAK, A. **Fundamental Cryobiology and Basic Physical, Thermodynamical and Chemical Aspects of Plant Tissue Cryopreservation**. In: ABDURAKMONOV, I. (Ed.) *Plant Breeding*. p. 41-56, 2012.

ANEXO

Protocolo de extração de DNA de eixos embrionários de sementes de araucária.

Protocolo a base de CTAB

OBSERVAÇÕES IMPORTANTES:

- Usar canetinhas próprias para marcação em vidro e plásticos.
 - Antes de iniciar a extração, ligar o banho-maria a 65°C para esquentar.
 - Usar os produtos B-mercaptoetanol, álcool isoprobílico, clorofórmio álcool isoamílico somente em capela de fluxo laminar.
- 1) Retirar os eixos embrionários de sementes de araucária e colocá-los em becker contendo água destilada e PVP (uma pitada). A retirada do embrião deve ser realizada com cuidado, pois danos no embrião podem comprometer a qualidade do DNA.
 - 2) Em seguida, colocar cinco eixos em almofariz e triturá-los com 1.000µL de tampão de extração CTAB aquecido a 65°C. Abaixo está citada a composição do referido tampão e as concentrações finais de cada constituinte.

Tabela 1 – Concentrações das soluções estoque e final dos reagentes constituintes do tampão de extração de DNA.

Estoque	Conc. final	Preparo de 10mL de Tampão
CTAB 5%	2%	4,0mL
NaCl 5M	1,4M	2,8mL
EDTA 0,5M	20mM	0,4mL
Tris HCl (pH 8,0) 1M	100mM	1,0mL
PVP sólido	2%	0,2g
B-Mercaptoetanol*	0,2%	20µL
H ₂ O completar o volume	---	1,8mL

*Colocar antes do uso, em capela de exaustão.

- 3) Transferir cerca de 800µL do macerado de eixos com tampão de extração, de cada amostra, para microtubo de 2,0mL identificados de acordo com cada amostra. A transferência deve ser realizada diretamente do almofariz para o microtubo, não usando micropipeta.

- 4) Deixar os microtubos identificados em banho-maria a 65°C, 40 minutos. Invertê-los a cada 10 minutos.
- 5) Adicionar 800µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e inverter os tubos por cinco minutos.
- 6) Centrifugar os tubos a 7.900 rpm, por 10 minutos e a temperatura ambiente.
- 7) Transferir o sobrenadante para um novo tubo identificado e adicionar 10µL de proteínase K em cada amostra (10mg/mL). Manter os tubos em temperatura de 37°C por 30 minutos.
- 8) Adicionar 1 volume de isopropanol gelado.
- 9) Colocar os tubos no freezer -20°C por duas horas.
- 10) Centrifugar por 10 minutos à 14.000rpm, a 4°C.
- 11) Descartar o sobrenadante e secar o pellet por 5 minutos.
- 12) Ressuspender o “pellet” em 300µL de TE contendo 40µg/µL de RNase A. Isso significa que para cada 300µL (uma amostra) deve ser utilizado 2µL de RNase. Pode ser preparado o volume total de TE com a quantidade final de RNase. Exemplo: 2 amostras: 2x300=600 + 4µL de RNase (2 amostras x 2µL de RNase).
- 13) Colocar em banho-maria 37°C por 30 minutos
- 14) Adicionar 800µL de isopropanol gelado e deixar precipitar por 2 minutos.
- 15) Centrifugar por 10 minutos à 14.000rpm, a 4°C.
- 16) Retirar o sobrenadante e secar o pellet em capela de exaustão, até que não haja gotas de álcool (15 a 20 minutos).
- 17) Solubilizar o pellet em 100µL de TE