

MARISOL FERRAZ

CRIOCONSERVAÇÃO DE SEMENTES, CALOS, GEMAS APICAIS E AXILARES DE  
*Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan. E RESGATE VIA CULTURA DE  
TECIDOS.

**FEIRA DE SANTANA – BA**

2012

MARISOL FERRAZ

CRIOCONSERVAÇÃO DE SEMENTES, CALOS, GEMAS APICAIS E AXILARES DE  
*Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan. E RESGATE VIA CULTURA DE  
TECIDOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> Claudineia Pellacani

FEIRA DE SANTANA – BA

2012

Aos meus pais, Vinícius e Edith pela vida e por me ensinarem a importância do aprender e do ensinar, dedico. (*In memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma participaram desse processo de aprendizagem e amadurecimento. Especial agradecimento ao amigo e sócio Daniel Kläy pelo incentivo e por assumir o trabalho durante o curso. Agradeço ao amigo Richard por ter plantado uma ideia anos atrás, a Dr. Miguel Pedro Guerra que com sua incomparável perspicácia indicou um caminho a seguir e com infinita paciência me ajudou nos primeiros passos. Aos professores da UEFS, em especial aqueles lotados na Estação Experimental Horto Florestal, pela acolhida e dedicação, particularmente meus orientadores, professores Lenaldo Muniz de Oliveira e Claudinéia Pelacani

Agradeço ainda a todos que com seu trabalho contribuíram de alguma forma na execução desta pesquisa. Aos funcionários da D.Käy Gems & Arts, Raide, Fábio, Eliene e Doralice que tiveram trabalho extra, devido à minha ausência. A Nilda e Marilene que do apartamento ao lado, zelam por mim. Aos funcionários da UEFS, particularmente Alberto pela sua preocupação nas questões burocráticas. Agradeço a Alone por sua dedicação ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e carinho com todos os estudantes e estagiários, a todos os funcionários do Horto Florestal na manutenção dos laboratórios e do indispensável café. Aos colegas por compartilhar este tempo de vida e pela ajuda nos laboratórios, especial agradecimento a Cíntia pela paciência e ajuda nos primeiros experimentos.

Por fim, e não menos importante agradeço ao Prof. José Raniere Ferreira de Santana pela coordenação séria e conscienciosa da pós-graduação. A UEFS, CAPES e PPBIO pelo apoio financeiro e infraestrutura disponibilizada.

Agradeço a todos e me desculpo com aqueles que não foram citados.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1- Os recursos genéticos do semiárido.....	1
2- A espécie <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.)Brenan.....	3
3- Conservação de recursos genéticosvegetais.....	5
4- Crioconservação de espécies arbóreas.....	7
REFERÊNCIAS.....	10
CAPÍTULO 1: Ajuste metodológico para crioconservação de sementes de <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.)Brenan.....	15
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	16
INTRODUÇÃO.....	17
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
Determinação do teor de umidade.....	19
Curva de embebição das sementes.....	19
Teste de germinação.....	19
Padronização do teste de tetrazólio.....	20
Crioconservação das sementes.....	20
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
Caracterização inicial das sementes.....	21
Curva de embebição e germinação.....	21
Padronização do teste de tetrazólio.....	22
Crioconservação das sementes.....	27
CONCLUSÕES.....	28
REFERÊNCIAS.....	29
CAPÍTULO 2: Crioconservação de calos de <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.)Brenan.....	31
RESUMO.....	32
ABSTRACT.....	32
INTRODUÇÃO.....	33
MATERIAL E MÉTODOS.....	35
Material vegetal.....	35

Obtenção dos calos.....	36
Vitrificação.....	36
Encapsulamento/ desidratação.....	37
Teste de viabilidade.....	38
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
CONCLUSÕES.....	43
REFERÊNCIAS.....	44
CAPÍTULO 3: Crioconservação de gemas apicais e axilares de <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.)Brenan.....	46
RESUMO.....	47
ABSTRACT.....	47
INTRODUÇÃO.....	48
MATERIAL E MÉTODOS.....	50
Local e material vegetal.....	50
Obtenção dos explantes.....	50
Vitrificação.....	51
Encapsulamento/ desidratação.....	52
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
CONCLUSÕES GERAIS.....	62
ANEXOS .....	63

## RESUMO

A caatinga fornece muitos produtos à população local: madeira, forragem, frutos, óleos e substâncias bioativas, entre outros. *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan, devido aos múltiplos usos e à exploração descontrolada tem sofrido diminuição das populações com perda significativa da variabilidade genética, o que tornam urgentes ações de conservação. Uma das alternativas mais promissoras, em longo prazo, é a crioconservação (nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ ), uma vez que, nessas condições, as reações bioquímicas e fisiológicas são completamente interrompidas e o material vegetal pode ser estocado por tempo ilimitado. Considerando a importância da espécie para o semiárido nordestino, objetivou-se com esse trabalho, além da qualificação profissional da proponente, o desenvolvimento de metodologias para a conservação de sementes e tecidos vegetais de *Anadenanthera colubrina* por criogenia. Os ensaios foram desenvolvidos no Laboratório de Germinação e de Cultura de Tecidos Vegetais da Unidade Experimentais Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana-BA, onde foi testada a crioconservação de sementes, gemas apicais, axilares e calos, utilizando diferentes metodologias: imersão direta em nitrogênio líquido, vitrificação e encapsulamento/desidratação. A imersão direta em nitrogênio líquido mostrou-se bastante eficiente na crioconservação de sementes inteiras, já o encapsulamento/desidratação, associado à utilização de sacarose como crioprotetor promoveu os melhores resultados na crioconservação dos demais tecidos estudados, quando comparado com o processo de vitrificação. Os resultados obtidos demonstram a clara necessidade de maiores investigações, embora aponte para a possibilidade de utilização dessa metodologia para a conservação *ex situ* da espécie.

Palavras-chave: conservação de germoplasma, caatinga, calogêse

## ABSTRACT

The caatinga provides many products to the local population: wood, fodder, fruits, oils and bioactive substances, among others. *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan, due to the multiple uses and uncontrolled exploitation has suffered declining populations with significant loss of genetic variability, which makes urgent conservation action. One of the most promising in the long term, is the cryopreservation (liquid nitrogen at -196°C), since, under these conditions, physiological and biochemical reactions are completely disrupted and plant material can be stored indefinitely. Considering the importance of this species for semiarid northeastern aimed to work with this, besides the professional qualification of the tenderer, the development of methodologies for the conservation of seeds and plant tissues of *Anadenanthera colubrina* by cryogenics. The tests were developed in the Laboratories of Germination and Plant Tissue Culture in the Experimental Unit Horto Florestal of Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, where we tested the cryopreservation of seeds, apical buds, axillary and calluses, using different methodologies: direct immersion in liquid nitrogen, vitrification and encapsulation / dehydration. The direct immersion in liquid nitrogen proved to be very effective in cryopreservation of whole seeds, the encapsulation / dehydration associated with the use of sucrose as cryoprotectant provide the best results in cryopreservation of other tissues studied, when compared with the vitrification process. The results demonstrate a clear need for further investigation, although point to the possibility of using this methodology for the *ex situ* conservation of the species.

Keywords: conservation of germplasm, caatinga, calogêse.



## **INTRODUÇÃO GERAL**

### **1. Os recursos genéticos do semiárido**

O semiárido ocupa uma extensão aproximada de 900 mil Km<sup>2</sup>, o que representa aproximadamente 55% de toda a região nordeste e 11% do território brasileiro (IBGE, 2007). A caatinga, vegetação predominante na região semiárida, é caracterizada como floresta arbórea ou arbustiva, com características xerofíticas (MOREIRA et al, 2006) e fornece inúmeros produtos e subprodutos à população local, desde madeira até os mais diversificados usos, como forragem, frutos, raízes, fitoterápicos e óleos, entre outros (MELO e CATARINA, 2008).

Entre os biomas encontrados na região semiárida a caatinga é o menos estudado e conhecido, por sempre ter sido tratado como região de baixa prioridade. Comumente a caatinga está associada ao fornecimento de recursos madeireiros e medicinais e como a base da economia da região sempre foi à agropecuária de sequeiro ou irrigada, em alguns locais, o gado foi e é até hoje criado solto e próximo aos mananciais de água, o que levou ao desenvolvimento das comunidades que faziam roçados destinados ao plantio de feijão, arroz, milho, mandioca e outros produtos de subsistência (FRANCA-ROCHA et al, 2007), formando uma sociedade extrativista por excelência e colocando, assim, em risco a estabilidade do bioma.

Acreditava-se que a caatinga seria o resultado da degradação de formações vegetais mais exuberantes, como a Mata Atlântica ou a Floresta Amazônica o que produziu uma falsa idéia de que o bioma seria homogêneo, pobre em espécies e endemismos, estando pouco alterada ou ameaçada. O semiárido está envolvido ainda, pela idéia de improdutividade, segundo a qual seria uma fonte menor de recursos naturais (ALBUQUERQUE e ANDRADE, 2002), entretanto, estudos apontam a caatinga como um bioma rico em biodiversidade, endemismos, bastante heterogêneo e extremamente frágil (ALVES, 2007).

Na caatinga já foram registradas 932 espécies arbóreas e arbustivas, sendo 380 endêmicas. As famílias mais frequentes são Caesalpinaceae, Fabaceae, Mimosaceae, Euphorbiaceae, e Cactaceae. (ALVES et al, 2009). Inúmeras espécies são localmente utilizadas como forrageiras, merecendo destaque o angico (*Anadenanthera macrocarpa* Benth), o pau-ferro (*Caesalpinia ferrea* Mart. Ex.Tul.), a catingueira (*Caesalpinia microphyla* Mart), a jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* Willd.) entre as espécies arbóreas; o mororó (*Bauhinia* sp.), o feijão-bravo (*Capparis flexuosa* L.), o mata-pasto (*Senna* sp.) entre as espécies arbustivas e subarbustivas. Entre as lianas e rasteiras destacam-se as mucunãs (*Stylobium* sp.) e as cunhas (*Centrosema* sp.). Entre as frutíferas, temos o umbu (*Spondias tuberosa* Arruda), araticum (*Annona glabra* L, *A. coriácea* Mart., *A. spinescens* Mart.) mangaba (*Hancornia speciosa* Gomez), jatobá (*Hymenaea* spp.), juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.), murici (*Byrsonima* spp.) e licuri (*Syagrus coronata* (Mart.) Becc.

Várias plantas da caatinga são consideradas como medicamentosas com larga utilização pela população local, entre elas destacam-se a aroeira (*Myracrodruon urundeuva* F.F.& M.M. Alemão), como adstringente; araticum (*Annona* sp.) como antidiarréico, pau d'arco (*Tabebuia impertiginosa* (Mart. ex DC. (Standl.) com ação anticancerígena. Como fonte de madeira para a produção de lenha, carvão e estacas destacam-se o angico-de-bezerro (*Piptadenia obliqua* (Pres.) Macbr.), sete-cascas (*Tabebuia spongiosa*), baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.) e umburana (*Commiphora leptophloeos*,Engl.) (DRUMOND,2000).

Entre as espécies com grande potencial para a exploração comercial devido aos múltiplos usos está a *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan. É muito utilizada como planta medicinal nas afecções pulmonares, como antidiarréico e adstringente. Além de fornecer madeira de boa qualidade, é produtora de taninos e goma (CARVALHO, 2003) que podem ser utilizados pela indústria química, mas sua exploração é essencialmente extrativista, o que levou à diminuição da população colocando em risco a variabilidade genética da espécie, tornando, desta forma, imprescindível e urgente o desenvolvimento de estudos, metodologia e estratégias para sua conservação e uso racional.

A exploração extrativista, desde a ocupação do semiárido, tem levado a uma rápida degradação desse importante bioma. Segundo estimativas, cerca de 70% do semiárido brasileiro já se encontra alterada pelo homem, e somente 0,28% de sua área encontra-se protegida em unidades de conservação (TABARELLI et al., 2000).

A intensa devastação do bioma caatinga é reflexo da ocupação territorial e da exploração desordenada dos recursos naturais. Os sucessivos impactos resultantes de diferentes ciclos de exploração, da concentração da população e dos maiores núcleos urbanos e industriais levaram a uma drástica redução na cobertura vegetal natural, hoje, fragmentada e fortemente dominada pela atividade antrópica. Essa devastação, acelerada ao longo das últimas décadas, resultou em alterações severas nos ecossistemas, especialmente pela perda e fragmentação de habitats, situação agravada pela perda de espécies dispersoras de sementes (PINTO et al., 2006). As implicações da fragmentação florestal sobre a biodiversidade ainda necessitam de melhor entendimento, porém diversos estudos têm demonstrado que a dispersão de sementes é afetada pela diminuição das áreas de preservação, queda no número de indivíduos de cada espécie e aumento do espaçamento entre as áreas. Portanto, quanto maior a fragmentação, maior a dificuldade de recuperação do bioma.

A diminuição das populações tem levado à erosão genética de muitas espécies, perda da variabilidade intraespecífica e conseqüente extinção de recursos genéticos. Como a conservação da diversidade biológica envolve não somente a preservação das espécies, mas também da diversidade genética contida em diferentes populações, é essencial proteger múltiplas populações da mesma espécie, que estão cada vez mais isoladas e suscetíveis a eventos de natureza genética ou demográfica, portanto, com maiores probabilidades de se extinguirem localmente (BROOKS et al, 2002).

Plantas arbóreas de grande ou médio porte, mesmo apresentando crescimento rápido, levam tempo até alcançarem a fase reprodutiva com produção de sementes e qualquer ação de recomposição florestal demanda uma ou duas décadas até que a área em questão esteja restabelecida. A manutenção da biodiversidade em longo prazo depende entre outras ações de proteção e manejo de espécies, da coleta e armazenagem de sementes com a formação e manutenção de bancos de germoplasma. Além da conservação da espécie para fins de recomposição ambiental, existe a necessidade crescente do mercado em relação produção de madeira e outros produtos de origem florestal, como resinas e taninos, compostos biologicamente ativos largamente utilizados pela indústria química e farmacêutica.

## **2. A espécie *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan**

*Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan, Magnoliophyta da ordem Fabales,

família Mimosaceae é conhecida vulgarmente como angico, angico branco, preto, vermelho; cambuí, cambuí-branco, cambuí-vermelho, cambuí-angico, etc. (CARVALHO, 2003). É uma árvore perenifólia a semicaducifólia, com 10 a 20 m de altura e 30 a 60 cm diâmetro do tronco; podendo atingir 35m de altura e 1m de diâmetro do tronco na idade adulta. O tronco é geralmente reto e mais ou menos cilíndrico; ramificação cimosa, dicotômica, tortuosa e irregular. Copa umbeliforme, bastante ramificada, com esgalhamento grosso. A casca apresenta espessura de até 20 mm, lisa, branca-acinzentada a cinza-escura, áspera e provida de fendas finas longitudinais. A casca interna é levemente avermelhada. As folhas são compostas bipinadas, paripinadas, raque da folha com 15 a 20 cm de comprimento com 15 a 35 pares de pinas multifoliados. As folhas apresentam glândulas. As flores são brancas a amareladas, pequenas, perfumadas, reunidas em inflorescências terminais. Fruto folículo deiscente por meio de fenda única, coriáceo, com as margens constrictas, marrom-escuro, estreito, com 11-30 cm de comprimento e 10 a 15 mm de largura e 5 a 15 sementes. As sementes são escuras, brilhantes, orbiculares, achatadas, com ala estreita e sem pleurograma, com até 15 mm de comprimento, não apresenta dormência, 15.600 a 23000un/kg (CARVALHO, 2003). *A.colubrina* é uma espécie hermafrodita, onde pequenos insetos são os vetores de polinização; a dispersão de frutos e sementes é autocórica, principalmente barocórica.

Tem ocorrência natural entre as latitudes 7°S no Piauí e 25°20'S no Paraná; na região nordeste ocorre entre os estados do PI e BA e nas regiões sudeste, centro-oeste e sul no estado do PR. Espécie pioneira a secundária inicial ou clímax exigente de luz. Ocorre naturalmente em solos de boa disponibilidade hídrica, férteis e profundos, com textura areno-argilosa a argilosa bem drenados. Ocorre também em solos rasos e de fertilidade química baixa (CARVALHO, 2003).

Estudos têm demonstrado que a *A.colubrina* tem usos mais amplos que o madeireiro. Recentemente foi identificada a ação da arabinogalactana, um heteropolissacarídeo ácido que contém principalmente galactose e arabinose – ARAGAL – isolado da goma da árvore; esse composto tem ação imunomoduladora e antitumoral (MORETÃO et al, 2003). De modo semelhante, foram quantificados elevados níveis de taninos, tanto na casca como nas folhas dessa espécie (MONTEIRO et al, 2005).

Popularmente, essa espécie tem sido muito utilizada na forma de infusão, maceração e tinturas como antidiarréico e expectorante; a casca apresenta propriedade adstringente, hemostática e depurativa; produz abundante goma-resina, considerada

sucedânea da goma-arábica; é uma planta melífera; a madeira tem diversos usos na construção civil e naval além de produzir lenha e carvão de boa qualidade é também recomendada para a recuperação de terrenos depauperados, erodidos, bem drenados, e para a reposição de mata ciliar em terrenos com inundação (CARVALHO, 2003).

As múltiplas utilidades colocaram esta espécie na lista das “Plantas do Futuro”, elaborada pelo Ministério do Meio Ambiente, isto é, plantas com grande potencial para desenvolvimento econômico e que necessitam de maiores estudos e, sobretudo, ações de conservação que assegurem o pool genético da espécie.

### **3. Conservação de recursos genéticos vegetais**

A diversidade biológica ou biodiversidade é representada por todas as espécies de plantas, animais, microrganismos, em interação com os ecossistemas e os processos ecológicos dos quais estas espécies fazem parte. Didaticamente dividem-se em diversidade genética, de espécies e de ecossistemas. A manifestação física da biodiversidade é representada pelos recursos genéticos, definidos como “espécies de plantas, animais e microrganismos de valor atual ou potencial” (GOEDERT, 2007). Estes recursos tratam da variabilidade genética entre as espécies (variabilidade interespecífica). O elemento dos recursos genéticos que maneja a variabilidade dentro de cada espécie (variabilidade intraespecífica), com fins de utilização para pesquisa em melhoramento, biotecnologia e conservação, denomina-se germoplasma. Não existe unidade de medida de germoplasma, entretanto, existem diferentes formas: sementes, planta in vivo ou in vitro, bulbo, tubérculo, rizoma, estaca, grão de pólen, meristema ou suspensão celular in vitro e mais recentemente DNA (GOEDERT, 2007).

O estabelecimento de processos voltados para a conservação de recursos genéticos é um problema real, que tem sido abordado de duas maneiras complementares: pela conservação *in situ*, que mantém as espécies em seu ambiente natural ou em pomares clonais, porém, sua manutenção requer grandes áreas de terra, tem altos custos de manutenção, são suscetíveis a stress ambiental e sujeitos à perigos como pestes, doenças, alterações genéticas então, o germoplasma pode ser facilmente perdido (erosão genética); e pela conservação *ex situ*, em que as espécies são diretamente manejadas pelo ser humano por meio da aplicação de métodos apropriados de coleta e posterior conservação do germoplasma (WALTER, CAVALCANTI e BIANCHETTI, 2007).

A conservação *ex situ* tem sido realizada via coleções cultivadas *in vitro*. Essas

coleções já foram estabelecidas para algumas espécies com propagação vegetativa e mantidas através da micropropagação tradicional, mas são muito caras, trabalhosas e sempre há risco de perda de acessos por contaminação, erro humano ou variação somaclonal, i.e., mutações, que ocorrem espontaneamente em cultura de tecidos e cuja frequência aumenta com a repetição de subcultivos (WITHERS e WILLIAMS, 1998).

Atualmente a conservação *in vitro* de germoplasma vegetal tem utilizado principalmente duas abordagens:

A) estocagem de crescimento lento, onde os riscos podem ser minimizados pelo retardamento do crescimento das culturas através da redução das temperaturas de incubação, de luminosidade, diminuição das trocas gasosas e/ou de componentes salinos e orgânicos, bem como a aplicação de retardantes de crescimento osmóticos e hormonais no meio nutritivo. Períodos de um a dois anos são considerados satisfatórios para a aplicação de técnicas de crescimento lento, que é limitado em dois aspectos: i) não é considerado muito seguro para sistemas de células não organizadas e calos com grande risco de variação somaclonal e ii) as condições não são consideradas suficientemente estáveis para a conservação em longo prazo, mesmo para explantes de partes aéreas (WITHERS e WILLIAMS, 1998).

B) crioconservação ou conservação por congelamento à temperatura ultra baixa, tem sido considerada uma alternativa para a conservação em longo prazo de recursos genéticos. A crioconservação, definida como a conservação de material biológico em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  ou em sua fase de vapor a  $-150^{\circ}\text{C}$  (KARTHA, 1985), inclui a crioconservação de protoplastos, suspensões celulares, calos, gemas apicais e laterais, meristemas, sementes, embriões somáticos e zigóticos e produtos biotecnológicos (culturas produtoras de metabólitos secundários de interesse econômico e linhagens celulares geneticamente modificadas) (SANTOS, 2000). Uma vez que com este método as reações bioquímicas e a maioria dos processos fisiológicos é completamente interrompido, o material vegetal pode ser estocado por período ilimitado (PANIS e LAMBARDI, 2006), que associado a técnicas de micropropagação, asseguram a conservação e a produção de mudas padronizadas de alta qualidade em número suficiente para suprir a demanda crescente do mercado.

Atualmente o método mais utilizado para conservação de germoplasma de plantas que possuem sementes com comportamento ortodoxo é a estocagem destas à baixa temperatura. Mesmo para a conservação de sementes ortodoxas a crioconservação oferece

vantagens em relação à longevidade das sementes que é mantida enquanto o estoque de nitrogênio líquido for mantido. A estocagem de sementes a  $-20^{\circ}\text{C}$  em bancos de sementes por longos períodos pode levar a danos genéticos e fisiológicos (PILATTI, 2011).

#### **4. Crioconservação de espécies arbóreas**

Diversos estudos sobre crioconservação de sementes de espécies florestais brasileiras têm sido feitos nas últimas décadas, como o realizado por Medeiros e Cavallari (1992), com sementes de *Astronium urundeuva*, onde as sementes mesmo sem dessecação (8,01% U.R.) sobreviveram ao congelamento, embora os melhores resultados tenham sido para sementes previamente dessecadas (5,96% U.R.). Salomão (2002) avaliou a capacidade de tolerância à temperatura ultra baixa ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), de 66 espécies tropicais do Cerrado e da Mata Atlântica com sementes ortodoxas e em 51 espécies a exposição ao nitrogênio líquido não afetou a germinabilidade, entre elas *Anadenanthera colubrina*, *Amburana cearensis*, *Dalbergia miscolobium*, *Crotalaris cf.spectabili*, *Jacaranda cuspidifolium*, *Tabebuia áurea*. Outros estudos demonstraram um aumento nos percentuais de germinação após a crioconservação em algumas espécies como a *Schinopsis brasiliensis*, crioconservadas tanto em nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) quanto em sua fase de vapor a  $-170^{\circ}\text{C}$  (GONZAGA *et al*, 2003).

Apesar das sementes de *Anadenanthera colubrina* serem classificadas como ortodoxas, possuem curta longevidade quando armazenadas em ambiente não controlado, à temperatura ambiente (MARQUES, 2007). Resultados mostram que após um período de 12 meses em câmara fria ( $8^{\circ}\text{C}$  e 45% U.R.), houve aumento no teor de umidade de 9% para 11% e queda do percentual de germinação de 100% para 66%. O mesmo foi observado quanto ao índice de velocidade de germinação (IVG), com redução do vigor das sementes ao longo do período de armazenamento (NERY, 2008). As sementes de *A. colubrina* crioconservadas em nitrogênio líquido não apresentaram diminuição da percentagem de germinação como demonstrado por Salomão (2002) e Nery (2008), já o IVG sofreu redução significativa durante o do período de armazenamento de doze meses (NERY, 2008). As sementes de *A. colubrina* possuem teor de umidade relativa de aproximadamente 7,0%, adequado à crioconservação através da imersão direta em nitrogênio líquido (SALOMÃO, 2002); já outros tecidos como gemas axilares, gemas laterais ou calos possuem grande quantidade de água e necessitam de outras abordagens a

fim de proteger os tecidos da exposição à temperatura ultra baixa e garantir a manutenção da viabilidade. Entre as técnicas mais utilizadas estão a vitrificação e o encapsulamento/desidratação.

A vitrificação é o processo através do qual a água sofre uma transição da fase líquida para um estado sólido amorfo e meta-estável, o sólido assim formado é na verdade uma solução supersaturada de alta viscosidade. Como agentes vitrificadores são utilizadas substâncias crioprotetoras como dimetilsulfóxido (DMSO), etileno glicol, metanol, glicerol e propileno glicol ou açúcares como a sacarose, trealose e glucose, tidos como excelentes agentes vitrificadores por não apresentam toxicidade para as células vegetais mesmo quando acumuladas em grande quantidade no citoplasma (SANTOS, 2000). Por meio da vitrificação, a formação de cristais de gelo intracelular é evitada usando uma solução crioprotetora muito concentrada para desidratar as células (SAKAY e ENGELMANN, 2007). Varias espécies de interesse comercial e agrícola foram crioconservadas por vitrificação, como *Prunus domestica* (BAGNIOL e ENGELMANN, 1991), *P. dulcis* (BRISON *et al*, 1995), *Chrysanthemum morifolium* (SAKAY *et al*, 2000), *Manihot spp.* (CHAROENSUB *et al*, 1999), *Solanum spp.* (LU e STEPONKUS, 1994). Recentemente, calos induzidos a partir de anteras de *Hervea brasiliensis* foram crioconservados em nitrogênio líquido pelo método de vitrificação e regenerados em plantas com sucesso (ZHOU *et al*, 2012).

A vitrificação é um método apropriado para a crioconservação de órgãos complexos, como brotos e embriões que contém tipos celulares diferentes e requerem somente a desidratação sob condições de congelamento (ENGELMANN, 2004). Meristemas são completamente preservados quando empregada a vitrificação, e os explantes são relativamente grandes (0,5 a 2-3 mm) e permitem a recuperação direta de tecidos organizados (ENGELMANN, 2010). A técnica de vitrificação aparenta ser um método eficiente para a crioconservação de uma grande variedade de plantas tropicais e de clima temperado, mas a aplicação e futuro desenvolvimento dependem do entendimento dos mecanismos envolvidos na indução à tolerância à desidratação e congelamento dos explantes (SAKAY e ENGELMANN, 2007).

A técnica de encapsulamento/desidratação baseia-se na tecnologia desenvolvida para a produção de sementes artificiais. Explantes são encapsulados em gel de alginato de sódio, os quais então passam por um pré-tratamento em um meio contendo altos níveis de sacarose e/ou outros crioprotetores e, em seguida, são desidratados por exposição ao ar da



capela de fluxo laminar ou com sílica gel e diretamente imersos em nitrogênio líquido (DEREUDDRE *et al.*, 1990). Nesse método a sobrevivência geralmente é alta e a recuperação do crescimento das amostras crioconservadas é geralmente rápida e direta, sem a formação de calos. Esta técnica já foi aplicada para a crioconservação de ápices de numerosas espécies de clima temperado e tropical, bem como para a crioconservação de suspensões celulares e embriões somáticos de outras espécies (ENGELMANN, 2010).

Uma das vantagens da técnica de encapsulamento/desidratação é a possibilidade de acrescentar nutrientes ou reguladores de crescimento na matriz de alginato, como no trabalho desenvolvido por Nair e Reghunath (2009), que acrescentaram 0,5M sacarose no meio com alginato na crioconservação de gemas axilares de *Indigofera tinctoria* (L.). Como a matriz de alginato é hidrofílica e permeável é possível manter os explantes já encapsulados em pré-tratamentos com crioprotetores por períodos prolongados. Usualmente a cultura de ápices em meio enriquecido com sacarose antes do encapsulamento aumenta a sobrevivência após a dessecação e congelamento (GOZALEZ-BENITO, 2004). Após o encapsulamento e eventual pré-tratamento as cápsulas devem passar por um processo de desidratação em fluxo laminar ou em sílica gel para diminuir o teor de água do explante até alcançar um índice aproximado de 20% de U.R. onde o percentual de sobrevivência é geralmente elevado e a retomada do crescimento é rápida e direta (ENGELMANN, 2004).

Protocolos para a crioconservação de várias espécies vegetais já foram desenvolvidos com sucesso, com alta taxa de recuperação dos explantes, utilizando a técnica de encapsulamento/desidratação, como em *Citrus* spp. (GONZALEZ-ARNAO *et al.*, 1998), *Solanum* spp. (FABRE e DEREUDDRE, 1990), *Vitis vinifera* (PLESSIS *et al.*, 1993) e *Wasabia japonica* (MATSUMOTO *et al.*, 1995). Anteras de *Oryza sativa* L. ssp. japônica var. Yerua P.A., foram crioconservadas por encapsulamento/desidratação com posterior recuperação de plantas férteis (MARASSI, SCOCCHI e GONZALEZ, 2006).

A conservação de espécies vegetais depende da manutenção da estabilidade genética e apesar de poucos estudos terem sido feitos a crioconservação parece manter esta estabilidade. Plantas de cana-de-açúcar derivadas de cepas crioconservadas não mostraram diferenças no desempenho em campo quando comparadas com não crioconservadas (GONZALEZ-BENITO *et al.*, 2004). Assim, a crioconservação é uma alternativa bastante promissora para a conservação genética de espécies vegetais, mas, os protocolos devem ser adequados às características fisiológicas de cada espécie e cada tipo de explante. Como o

número de espécies que devem ser conservadas é muito elevado, existe a necessidade premente de novos estudos a fim de refinar os protocolos e assegurar a formação de criobancos de germoplasma, capazes de conservar material biológico em pequeno espaço e com custo relativamente baixo por tempo indeterminado.

Assim, com o intuito de contribuir com a formação do banco de germoplasma desta espécie florestal e garantir sua conservação foram realizados ensaios de crioconservação de sementes inteiras de *A. colubrina* por imersão direta em nitrogênio líquido, descritos no capítulo 1. O capítulo 2 trata dos ensaios de crioconservação das gemas apicais e laterais de plântulas cultivadas *in vitro*, utilizando dois métodos: vitrificação e encapsulamento/desidratação. Essas mesmas técnicas foram empregadas para a crioconservação dos calos desenvolvidos a partir de segmentos internodais da espécie e estão descritas no capítulo 3.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, U.P. e ANDRADE, L.H.C. Conhecimento botânico tradicional e conservação de uma área de caatinga no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Acta Botânica Brasileira**. v.16(3):p.273-285. 2002.
- ALVES, J.J.A. Geocologia da caatinga no semi-árido do Nordeste brasileiro. **Climatologia e Estudos da Paisagem**. v.2(1):p.58-71. 2007.
- ALVES, J.J.A., ARAÚJO, M.A. e NASCIMENTO, S.S. Degradação da caatinga: uma investigação ecogeográfica. **Revista Caatinga**. v.22(3):p.126-135. 2009.
- BAGNIOL, S. e ENGELMANN, F.; Effects of pregrowth and freezing conditions on the resistance of meristems of date (*Phoenix dactylifera* L. var. *Bou Sthammi Noir*) to freezing in liquid nitrogen. **CryoLetters**. v.12: p. 279-286, 1991.
- BRISON, M.; DE BOCAUD, M.T.; DOSBA, F. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of two interespecific *Prunus* rootstocks. **Plant Sciences**, v. 105: p. 235-242. 1995.
- BROOKS, T.M.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; RYLANDS, A.B.; KONSTANT, W.R.; FLICK, P.; PILGRIM, S.; OLDFIELD, S.; MAGIN G. e HILTON-TAYLOR. Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. **Conservation biology**. 16(4): p.909-923. 2002.

CHAROENSUB, R.; PHANSIRI, S.; SAKAY, A.; YONGMA-NICTCHAI, W.; Cryopreservation of cassava in vitro grown shoot tips cooled to -196° by vitrification. **CryoLetters**. v.20: p.89-94, 1999.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica; Colombo,PR: Embrapa Florestas, v.1 1ª Ed. 2003. p.91-97.

DEREUDRE, J.; SCOTTEZ, C.; ARNAUD, Y. e DURON, M. Résistance d'apex caulinaires de vitro-plants de Poirier (*Pyrus communis* L. cv. Beurré Hardy), enrobés dans l'alginate, à une déshydratation puis à une congélation dans l'azote liquide: Effet d'un durcissement préalable au froid. **Compte Rendu de l'Académie des Sciences du Paris Series**, 3 (310): 317-323, 1990.

DRUMOND,M.A.; KIILL,L.H.P; LIMA, P.C.F.;OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, V.R.;ALBUQUERQUE, S.G.; NASCIMENTO, C.E.S. e CAVALCANTI,J. **Estratégias para uso sustentável da biodiversidade da Caatinga**. Petrolina. 2000.

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

ENGELMANN, F.; Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular Developmental Biololy –Plant**. Invited review, 2010.

FRANCA-ROCHA,W.;SILVA, A.B.; NOLASCO, M.C.; LOBÃO,J.; BRITTO, D.;CHAVES, J.M.; ROCHA, C.C.Levantamento da cobertura vegetal e do uso do solo do Bioma Caatinga. **Anais XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**. p.2629-2636. INPE. 2007.

FABRE, J. e DEREUDRE, J. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of Solanum shoot tips. **CryoLetters**. v.11, p.413-426, 1990.

GOEDERT, C.O. Histórico e Avanços em Recursos Genéticos no Brasil. in NASS, L.L. **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p.24-60.

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**. v.5, (2): p.145-154. 2003.

GONZALEZ-ARNAO, M.T.; ENGELMANN, F.; URRÁ, C.; MORENZA, M. e RIOS, A.. Cryopreservation of citrus ápices using the encapsulation-dehydration technique. **CryoLetters**. v. 19 p. 177-182, 1998.

GONZALEZ-BENITO, M.E.; CLAVERO-RAMÍREZ, I.; LOPEZ-ARANDA, J.M. Review: The use of cryopreservation for germplasm conservation of vegetatively propagated crops. **Spanish Journal of Agricultural Research**. v.2, nº3, p.341-351, 2004.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Mapa de Biomas e Vegetação**. 2007.

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

LAMBARDI, M. e BENELLI, C. La crioconservazione per la tutela del germoplasma delle specie arboree. **Fruticoltura**. nº6, p. 34-39. 2007.

LU, S.; STEPONKUS, P.L. Cryopreservation of Solanum shoot tips by vitrification. **Cryobiology**. v. 31, p. 569, 1994.

MARASSI, M.A.; SCOCCHI, A. e GONZALEZ, A.M. Plant regeneration from anthers cryopreserved by an encapsulation/dehydration technique. **In Vitro Cellular Developmental Biology –Plant**. v.42, p. 31-36, 2006.

MARQUES, M.A. **Secagem e armazenamento de sementes de *Anadenanthera peregrina* var. *falcata* (Benth.) Altschul e *A. colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul**. 2007. 124p. Tese (Doutorado em Agronomia)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

MATSUMOTO, T.; SAKAY, A.; TAKAHASHI, C. e YAMADA, K. Cryopreservation of in vitro grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation vitrification method. **CryoLetters**. v.16, p.189-196, 1995.

MEDEIROS, A.C.S. e CAVALLARI, D.A.N. Conservação de germoplasma de aroeira *Astronium urundeva* (FR.ALL) Engl.I. Germinação de sementes após imersão em nitrogênio líquido (-196°C). **Revista Brasileira de Sementes**. v.14, (1), p. 73-75, 1992.

- MELO, R.R.; CATARINA, T. Alternativas e caracterização da Caatinga em assentamentos rurais no Estado do Rio Grande do Norte. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v.3(2). p.126-131. 2008.
- MONTEIRO, J.M.; NETO, E.M.F.L.; AMORIM, E.L.C.; STRATTMANN, R.R.; ARAÚJO, E.L.; ALBUQUERQUE, U.P. Teor de taninos em três espécies simpátricas da caatinga. **Revista Árvore**. v.29, p.6. 2005.
- MOREIRA, J.N.; ALMEIDA, C.F. ALBUQUERQUE, U.P.; LUCENA, R.F.P.; FLORENTINO, A.T.N. e OLIVEIRA, R.L.C. Use and traditional management of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. v.2: p. 6. 2006.
- MORETÃO, M.P.; BUCHI, D.F.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M.B.M.; Effect of na acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. **Immunology Letters**. 89 p.175-185. (2003).
- NAIR, D.S. e REGHUNATH, B.R. Cryoconservation and regeneration of axillary shoot meristems of *Indigofera tinctoria* (L.) by encapsulation-dehydration technique. **In Vitro Cellular Developmental Biololy –Plant**. v.45, p. 565-573, 2009.
- NERY, F.C. **Germinação, cultivo in vitro e tolerância ao congelamento de sementes de Angico vermelho (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan)**. 2008. 215p. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal de Lavras – MG.
- PANIS, B. e LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants ( crops and forest trees), in **The Role of biotechnology in exploring and protecting agricultural** cap.6, p61-78. FAO, Rome. 2006.
- PILATTI, F.K.; AGUIAR, T.; SIMÕES, T.; BENSON, E.E.; VIANA, A.M. *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. **In Vitro Cellular Developmental Biololy –Plant..** v. 47, p.82-98, 2011.
- PINTO, L.P.; BEDÊ, L.; PAESE, A.; FONSECA, M.; PAGLIA, A. e LAMAS, I. Mata Atlântica Brasileira: Os desafios para a conservação de um *hotspot* Mundial, in ROCHA, C.F.D.; BERGALHO, M.A.S.A. e VAN SUYS, M. **Biologia da conservação: Essências**. cap. 4. P69-96. 2006.

- PLESSIS, P.; LEDDET, C.; COLLAS, A.; e DEREUDRE, J. Cryopreservation of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay shoot tips by encapsulation-dehydration: effect of pre-treatment, cooling and postculture conditions. **CryoLetters**. v.14, p. 309-320, 1993.
- SAKAY, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus senensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**. v.9, p.30-33, 1990.
- SAKAY, A.; MATSUMOTO, T.; HIRAI, D. e NIINO, T. Newly development encapsulation-dehydration protocol for plant cryopreservation. **CryoLetters**. v.21, p. 53-62, 2000.
- SAKAY, A.; ENGELMANN, F.; Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. **CryoLetters**. v.28, (3), p.151-172, 2007.
- SALOMÃO, A.N., Tropical seed species, responses to liquid nitrogen exposure. **Brazilian Journal Plant Physiology**. v.14 (2), p. 133-138, 2002.
- SANTOS, I.R.I. Crioconservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia vegetal**. v. 12 (Edição especial): 70-84, 2000.
- TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C.; SANTOS, A. M. M.; VICENTE, A. Análise da representatividade das unidades de conservação de uso direto e indireto da Caatinga: análise preliminar. In J. M. C. SILVA & M. TABARELLI (coord.). Workshop **Avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma Caatinga**. Pretolima, Pernambuco.
- WALTER, B.M.T.; CAVALCANTI, T. B.; BIANCHETTI, L.B. Princípios sobre coleta de germoplasma vegetal. In NASS, L.L. **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p.194-229.
- WITHERS, L.A.; WILLIAMS, J.T. Conservação in vitro de recursos genéticos de plantas in TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. & BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/EMBRAPA, v.1. 1998. p. 297-330.
- ZHOU, Q.; SUN, A.; LI, Z.; HUA, Y. JIANG, Z.; HUANG, T.; DAÍ, X.; HUANG, H. Cryopreservation and plant regeneration of anther callus in *Hervea* by vitrification. **African Journal of Biotechnology**. v. 11(28), p. 7212-7217, 2012.

## **CAPÍTULO I**

### **AJUSTE METODOLÓGICO PARA CRIOCONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE *Anadenanthera colubrina* (VELLOSO) BRENAN**

## **AJUSTE METODOLÓGICO PARA CRIOCONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE *Anadenanthera colubrina* (VELLOSO) BRENNAN**

**FERRAZ, M.<sup>1\*</sup>; SOUZA, C.L.M.<sup>1</sup>; PELACANI, C.<sup>1</sup>; OLIVEIRA, L.M.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Avenida Transnordestina, S/N, Novo Horizonte, CEP: 44.036.900, Feira de Santana-Bahia, Brasil. <sup>1\*</sup>marisolfz.ferraz@gmail.com.

**RESUMO:** *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan é uma leguminosa com ampla utilização madeireira, excelente para a recomposição ambiental e popularmente usada nas afecções pulmonares e intestinais. Possui grande potencial para exploração econômica pela indústria química e farmacêutica, mas, devido à ocupação desordenada do território e ao uso extrativista descontrolado está sob risco de perda da variabilidade genética, tornando a conservação do germoplasma existente uma necessidade real e urgente. A criopreservação de sementes pode ser uma boa alternativa para a conservação da espécie. Neste estudo foi testada a criopreservação de sementes por imersão direta em nitrogênio líquido (-196°C) e duas metodologias de descongelamento, lento e rápido. Para a determinação da viabilidade das sementes foram testadas três concentrações de cloreto 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) (0,025%, 0,05% e 0,075%) e dois tempos de incubação (18 e 24 horas). A imersão direta em nitrogênio líquido mostrou-se eficiente na criopreservação de sementes inteiras, não sendo observadas diferenças entre os métodos de descongelamento. As concentrações de 0,05% e 0,075% de TTC e os dois tempos de incubação podem ser usados na determinação da viabilidade das sementes, porém estudos mais detalhados são necessários para maior compreensão da fisiologia da semente de *A. colubrina* (Vell.) Brenan.

**Palavras-chave:** Conservação de germoplasma, sementes, teste de tetrazólio.

**ABSTRACT:** *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan is a Leguminosae with extensive timber use, excellent for environmental restoration and popularly used in intestinal and pulmonary disorders. It has great potential for economic exploitation by the chemical and pharmaceutical industry, but due to the occupation of the territory and uncontrolled extractive use is under risk of loss of genetic variability, making the conservation of germplasm real and urgent an issue. Cryopreservation of seeds can be a good alternative for the conservation of the species. In this study we tested the



cryoconservation of seeds by immersion in liquid nitrogen (-196oC) and two methods of thawing, slow and fast. To determine the viability of seeds were tested with three concentrations of 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride (TTC) (0.025%, 0.05% and 0.075%) and two incubation times (18 and 24 h). The direct immersion in liquid nitrogen proved to be effective in cryopreservation of whole seeds, no differences were observed between the methods of thawing. Concentrations of 0.05% and 0.075% TTC and the two incubation times can be used in determining the viability of seeds, but further studies are needed for a better understanding of the physiology of seed *A. colubrina* (Vell.) Brenan.

**Keywords:** Conservation of germplasm, seeds, tetrazolium test.

## INTRODUÇÃO

*Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan, família Mimosaceae, conhecida vulgarmente como angico ou cambuí, é uma árvore perenifólia podendo atingir até 35 metros de altura. É uma espécie pioneira, secundária inicial ou clímax exigente de luz, excelente para a recomposição de terrenos depauperados ou erodidos (CARVALHO, 2003). Além do uso madeireiro e ambiental, *A. colubrina* possui potencial produtivo para indústria química e farmacêutica; já foram quantificados elevados níveis de taninos, tanto na casca como nas folhas (MONTEIRO *et al*, 2005), bem como ação imunomoduladora e antitumoral, atribuída a um heteropolissacarídeo ácido que contém principalmente galactose e arabinose (aragal) isolado da goma da árvore (MORETÃO *et al*, 2003). Popularmente, essa espécie é utilizada na forma de infusão como antidiarréico e expectorante (MOREIRA *et al*, 2006). Os diferentes usos e possibilidades dessa espécie determinam um grande potencial para desenvolvimento econômico, mas ao mesmo tempo tem aumentado os riscos de erosão do seu pool genético, em virtude do uso extrativista descontrolado.

A preservação da variabilidade genética da *A. colubrina* é uma necessidade real, sendo a conservação de sementes uma alternativa a ser utilizada para a conservação em longo prazo, em virtude da facilidade de armazenamento, possibilidade de cobertura de grande variabilidade do pool gênico existente, aliado ao baixo custo. As sementes da *A. colubrina* são classificadas como ortodoxas, isto é, resistentes à dessecação, mas quando armazenadas em ambiente não controlado, possuem curta longevidade (MARQUES, 2007). Resultados de pesquisa com a conservação de sementes dessa espécie têm

demonstrado ainda, que, após um período de 12 meses em câmara fria (8°C e 45% de U.R.), ocorre aumento no teor de umidade e queda na germinação, no vigor e no índice de velocidade de germinação das sementes (NERY, 2008).

A criopreservação, definida como a conservação de material biológico em nitrogênio líquido, a -196°C ou em sua fase de vapor a -150°C (KARTHA, 1985), representa uma excelente alternativa para a conservação genética do germoplasma de espécies arbóreas. Essa alternativa tem sido utilizada com êxito para a conservação de diversas espécies vegetais: Salomão (2002) avaliou a capacidade de tolerância à temperatura ultra baixa (-196°C) de 66 espécies tropicais do Cerrado e da Mata Atlântica com sementes ortodoxas e, em 51 espécies a exposição ao nitrogênio líquido não afetou a germinabilidade, entre elas *Anadenanthera colubrina*, *Amburana cearensis*, *Dalbergia miscolobium*, *Crotalaria cf. spectabili*, *Jacaranda cuspidifolium* e *Tabebuia aurea*.

Nery (2008) em seus experimentos com *Anadenanthera colubrina*, criopreservou com sucesso sementes, mas no estabelecimento do cultivo *in vitro*, obteve a formação espontânea de calos e não conseguiu promover brotamento e enraizamento adequados para a conservação em longo prazo.

Na criopreservação o descongelamento é tão importante quanto o congelamento propriamente dito, pois os dois momentos podem levar à formação de cristais de gelo no interior das células, o que pode acarretar danos irreversíveis às membranas e conseqüente perda de viabilidade (SANTOS, 2000). Contudo, independentemente das dificuldades inerentes ao método, o sucesso da criopreservação depende da qualidade fisiológica inicial das sementes. Um método rápido e confiável na determinação da viabilidade e vigor das sementes é o teste do tetrazólio, que se baseia na atividade das enzimas desidrogenases, particularmente da desidrogenase do ácido málico, que reduz o sal de tetrazólio nos tecidos vivos, formando um composto vermelho, não difusível, conhecido como trifênilformazan (ZONTA *et al*, 2009). Além do pré-condicionamento do material, a concentração da solução de tetrazólio, o tempo de exposição, a temperatura de condicionamento e a avaliação adequada são fundamentais para que se obtenham resultados confiáveis sobre a qualidade do material a ser armazenado (MENDES, BASTOS e MELO; 2009).

Diante do exposto, este estudo teve como objetivos determinar a concentração de tetrazólio e o tempo de incubação que resultem em uma avaliação correta da viabilidade das sementes de *A. colubrina* e testar a viabilidade da criopreservação das sementes por

imersão direta em nitrogênio líquido, comparando a eficiência de dois tipos de descongelamento das sementes: lento (temperatura ambiente) e rápido (banho-maria 40°C por 5min).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os ensaios foram desenvolvidos nos Laboratórios de Germinação e de Cultura de Tecidos Vegetais da Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana-BA. Foram utilizadas sementes provenientes de matrizes localizadas da região de Juitá, Petrolina – PE, colhidas entre ago/set de 2008 e 2010, acondicionadas em sacos de algodão e conservadas em refrigerador (5-10°C).

### **CARACTERIZAÇÃO INICIAL DAS SEMENTES**

#### **- Determinação do teor de umidade.**

Para a determinação do grau de umidade foi usado o método da estufa em que as sementes foram colocadas em estufa à 105°C por 24h. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições de 25 sementes. O grau de umidade foi calculado pela diferença entre o peso fresco e seco das sementes, expresso em percentagem (BRASIL, 2009).

#### **- Curva de embebição das sementes.**

A curva de embebição das sementes foi realizada com sementes colhidas em setembro 2010. As sementes foram divididas em quatro amostras de 25 sementes cada e colocadas em rolo de papel Germtest® umedecido com quantidade de água destilada equivalente a 2,5 vezes o peso do papel e, em seguida, transferidas para a câmara de germinação, a temperatura de 30°C, na presença de luz (fotoperíodo de 12h). A primeira pesagem foi realizada com as sementes secas e, posteriormente, a cada hora, durante 24 horas. A curva de embebição foi acompanhada por teste de germinação.

#### **-Teste de germinação**

Os testes de germinação foram realizados com sementes inteiras em rolo de papel germitest® embebido em água destilada e posicionado verticalmente, em lotes de 100 sementes (4 x 25), sendo a protrusão radicular utilizada como critério para a avaliação da

germinação. Para os experimentos de crioconservação, simultaneamente, foi calculado o índice de velocidade de germinação (IVG), tomando-se o número de sementes germinadas no total a cada dia de avaliação. Para os ensaios de padronização do teste de tetrazólio foram consideradas, além das sementes germinadas, a formação de plântulas normais e anormais, seguindo-se as Regras de Análise de Sementes (Brasil, 2009).

#### **-Padronização do teste de tetrazólio**

Foram utilizadas sementes colhidas em Jutaí, Petrolina-PE, entre os meses de agosto e setembro de 2008, acondicionadas em sacos de algodão e armazenadas em refrigerador por três anos. Antes dos ensaios de padronização quantificou-se a viabilidade do lote de sementes, verificada através do teste de germinação, bem como o percentual de sementes danificadas, essencial na determinação das categorias de viabilidade para a padronização do teste de tetrazólio. Após um período de embebição de 6 horas em água destilada a 25°C, as testas das sementes foram retiradas manualmente e os cotilédones cortados na borda inferior, antes da incubação no tetrazólio, para facilitar a difusão do reagente. Foram testados dois tempos de incubação com cloreto 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) (18 e 24h) e três concentrações (0,025; 0,05 e 0,075%).

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3 (2 tempos de incubação, 3 concentrações de tetrazólio), com quatro repetições de 20 sementes. Simultaneamente foi conduzido um teste de germinação com quatro repetições de 25 sementes, colocadas em rolo de papel germtest® em pé, embebido em água destilada em câmara de germinação a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, por quatro dias, com avaliações feitas a cada 24 horas.

O teste de tetrazólio foi acompanhado por teste de germinação para estabelecer a relação entre os padrões de coloração das sementes no teste e os índices de germinação e vigor das sementes.

Foi aplicada análise de variância para testar o grau de significância entre as concentrações e os tempos de incubação com tetrazólio e o teste de germinação, utilizando-se o Teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação das médias.

#### **Crioconservação de sementes**

Os ensaios de crioconservação foram realizados com as sementes inteiras de *A. colubrina*, colhidas em 2010 e armazenadas em saco de algodão em refrigerador por um

ano antes do início dos experimentos. As sementes foram envolvidas em papel alumínio acondicionadas em saco plástico e congeladas através de imersão direta em nitrogênio líquido, segundo metodologia descrita por Nery (2008). Após 10 dias de congelamento as amostras foram descongeladas, sendo um lote rapidamente (5 min.) em banho-maria a 40°C e outro lentamente, à temperatura ambiente. Após o descongelamento as sementes foram submetidas a teste de germinação como o descrito no item anterior. Como controle da eficiência da crioconservação os resultados obtidos no teste de germinação foram comparados com os obtidos no teste de germinação de sementes não crioconservadas.

Para avaliação da crioconservação foi usado delineamento inteiramente casualizado e calculado por uma ANOVA no esquema 2 x 2 (sementes com e sem crioconservação e descongelamento rápido e lento), com quatro repetições com 25 sementes. Após a análise de variância, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey 5% de probabilidade de erro.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Caracterização inicial das sementes**

Nos experimentos com sementes de *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan foram utilizados dois lotes. Na padronização do teste de tetrazólio foram usadas sementes colhidas em 2008, com três anos de armazenamento em refrigerador com viabilidade de 66% e umidade de 7,46% (anexo 1), por apresentar também sementes inviáveis, com baixo vigor e danificadas, para que a coloração do teste pudesse ser relacionada com a viabilidade e vigor das sementes.

As sementes de *A. colubrina* utilizadas para a crioconservação (lote 2010) apresentaram 7,41% umidade no momento da instalação do experimento (Anexo 1), e viabilidade de 90% (Figura 1).

### **Curva de embebição e germinação**

As sementes de *A. colubrina* apresentaram embebição rápida nos primeiros minutos após início da incubação, o que se deve a elevada permeabilidade do seu tegumento a água. Foi observado o incremento de 15% no peso das sementes na primeira hora, seguido por um ganho de massa contínuo, por três horas, de aproximadamente 10% do peso a cada hora e, entre a quarta e décima sexta hora de embebição, um ganho de massa de aproximadamente 6% a cada hora (Figura 1). Segundo Ferreira e Borghetti (2004) a pri-

meira etapa de embebição refere-se à absorção osmótica da água, necessária para ativação do metabolismo da semente, enquanto que o ganho subsequente deve-se tanto a absorção de água quanto à produção de tecidos do processo de germinação. Com base na curva de embebição obtida, o tempo de pré-condicionamento das sementes para a realização do teste de tetrazólio foi estabelecido em 6 horas, por ser esse um tempo de embebição suficiente para a ativação do metabolismo das sementes.

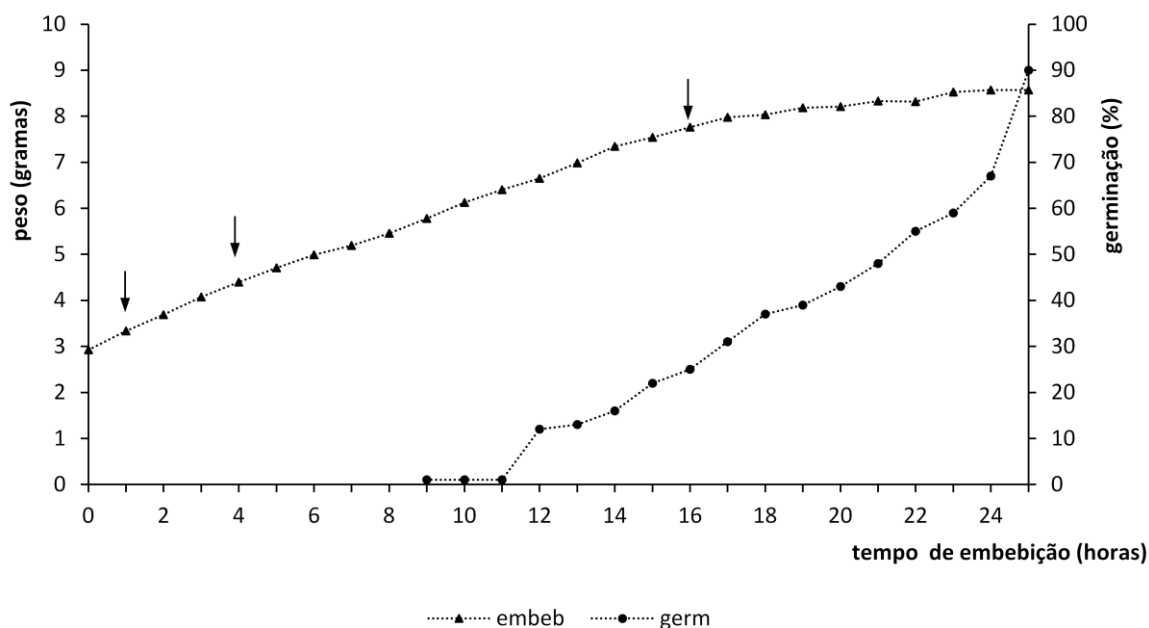








Figura1: Curvas de embebição e de germinação de sementes de *Anadenanthera colubrina*. Germinação expressa em porcentagem de sementes germinadas e embebição por peso médio das sementes em gramas. As setas indicam pontos de alteração da velocidade de embebição.

### Padronização do teste de tetrazólio

A análise das sementes de *A. colubrina* submetidas à coloração com tetrazólio e sua correlação com o teste de germinação permitiu a identificação de 15 tipos principais de coloração, que foram organizados em três classes: I) sementes germináveis com alto vigor - sementes com coloração vermelha uniforme nos cotilédones e embrião, vermelha nos cotilédones e embrião rosado, centro do cotilédone rosado ou com áreas de borda não coradas e embriões vermelhos ou rosados uniforme; II) sementes germináveis com baixo vigor - aquelas com grandes áreas de cotilédone (mais de 60%) sem coloração e embriões corados e III) sementes não germináveis - com embriões ou partes deste não corados

(radícula e plúmula), cotilédones sem coloração na região do hilo, e cotilédones e embrião sem coloração (Tabela 1). Para definição dessas classes foram consideradas sementes com alto vigor aquelas intactas, com todas as suas estruturas bem desenvolvidas e que desenvolveram plântulas normais, e com baixo vigor aquelas com desenvolvimento retardado ou com formação de estruturas anormais (ausência ou deficiência no desenvolvimento de partes essenciais, como sistema radicular e partes aéreas) (Figura 1), o que interfere no potencial desenvolvimento da planta (Brasil, 2009).

Tabela 1. Padrões de coloração de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan, obtidos a partir dos testes de cloreto 2,3,5 trifenil tetrazólio (TTC) e de germinação, com as diferentes classes de viabilidade definidas e associadas ao vigor.

PADRÃO DE COLORAÇÃO*		CLASSE	VIABILIDADE
	Embrião rosado ou vermelho, cotilédone totalmente corado	I	GERMINÁVEL ALTO VIGOR
	Pouca coloração no centro do cotilédone, embrião corado. Cotilédone corado na região do hilo e/ou área corada $\geq$ a 50%	I	GERMINÁVEL ALTO VIGOR
	Cotilédones com área superior a 50% sem coloração, embriões corados	II	GERMINÁVEL BAIXO VIGOR
	Embriões ou partes não corados, cotilédones corados	III	NÃO GERMINÁVEL
	Região do hilo, radícula, plúmula e cotilédone sem coloração	III	NÃO GERMINÁVEL
	Embrião e cotilédone sem coloração.	III	NÃO GERMINÁVEL

\*Ilustração confeccionada pelo autor

Quando comparamos os resultados obtidos pela análise visual das sementes coradas nas diferentes concentrações de TTC e tempos de incubação, e os resultados obtidos no teste de germinação, podemos verificar que a concentração de 0,025% foi insuficiente para promover uma boa coloração das sementes e, conseqüentemente, a avaliação da viabilidade, pois os cotilédones e embriões ficaram com coloração tendendo ao laranja, mostrando reação fraca ao sal de tetrazólio, o que pode ser confundido com baixa

viabilidade ou vigor das sementes (Figura 3 e Tabela 2). Por outro lado, as concentrações de 0,05 e 0,075% de TTC nos dois tempos de incubação, 18 e 24 horas, mostraram-se eficazes na determinação da viabilidade das sementes e não apresentaram diferenças significativas entre si e quando comparadas com o teste de germinação das sementes não tratadas (Tabela 2).

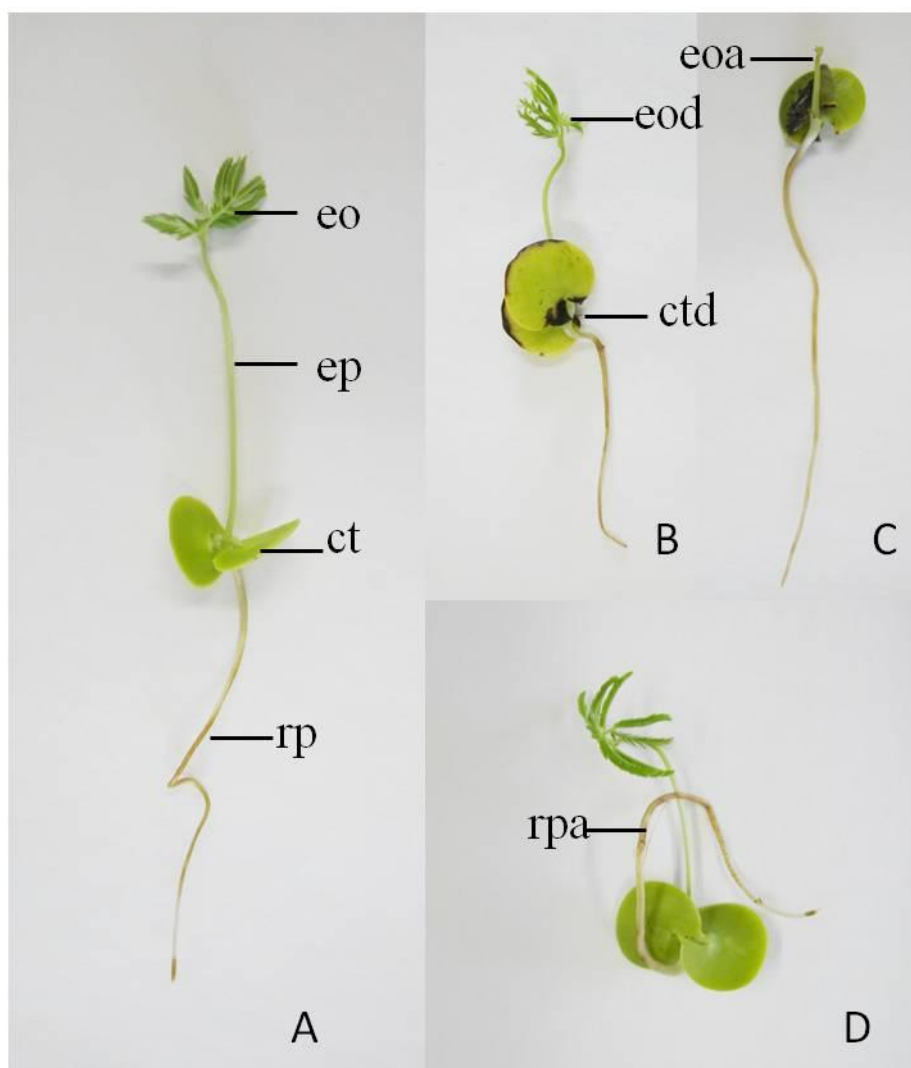


Figura 1: A) Plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Velloso)Brenan com desenvolvimento normal: eo – eofilo; ep – epicótilo; ct – cotilédone; rp – raiz primária. Plântulas anormais: B – eod - eofilo pouco desenvolvido e cotilédone danificado na região do hilo (ctd); C- eofilo ausente (eoa), D – raiz primária com desenvolvimento anormal (rpa). Foto: M. Ferraz, LAGER/UEFS. 2012.





Figura 2: Coloração das sementes de *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan, após incubação em solução de cloreto 2,3,5 trifenil tetrazólio (TTC) a 30°C por 18h: A - 0,025%. B- 0,05%. C- 0,075%. Foto: M. Ferraz, LAGER/UEFS. 2012.

Tabela 2: Avaliação da viabilidade das sementes de *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan, submetidas à incubação com diferentes concentrações de cloreto 2,3,5 trifenil tetrazólio (TTC) e pelo teste de germinação. Resultados expressos em média de sementes viáveis quantificadas pelo teste visual comparativo de cores e média de sementes viáveis obtida com teste de germinação.

Concentração de tetrazólio (%)	Tempo de incubação	Quantificação visual das sementes viáveis pelo teste TTC (%)*
0,075	18h	65,0 <sup>a</sup>
0,075	24h	65,0 <sup>a</sup>
0,05	18h	62,5 <sup>a</sup>
0,05	24h	60,0 <sup>a</sup>
0,025	18h	32,5 <sup>b</sup>
0,025	24h	40,0 <sup>b</sup>
Germinação		64,0 <sup>a</sup>

\*Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Na comparação dos padrões de coloração do teste de tetrazólio em diferentes concentrações, não se verificou diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de 0,05% e 0,075%, nem entre os tempos de incubação de 18 e 24 horas (Tabela 2). A coloração variou de rosado a vermelho intenso. A coloração rosada, contudo, já foi descrita para outras espécies como coloração de sementes viáveis em razão das dificuldades para a difusão da solução de TTC ou para a estabelecimento da coloração de grande quantidade de lipídeos nas sementes (Wood et al., 2005). A avaliação visual, com a determinação da viabilidade usando os padrões de coloração descritos na tabela 1, mostrou-se eficiente uma vez que os índices encontrados estão de acordo com os valores obtidos nos testes de germinação das sementes (Tabela 2) e não apresentaram diferença significativa na ANOVA aplicada (anexo 2).

### Crioconservação de sementes

A ANOVA (anexo3), do teste de germinação das sementes demonstrou não haver diferenças significativas entre a viabilidade das sementes crioconservadas, submetidas aos dois tipos de descongelamento e as sementes não crioconservadas (Tabela 3).

Os testes de germinação demonstraram não haver diferenças significativas entre as percentagens de germinação das sementes crioconservadas e não crioconservadas, entretanto, o índice de velocidade de germinação (IVG) mostrou diferenças significativas quando aplicado teste Tukey a 5% de probabilidade de erro (Tabela 3). Os testes de tetrazólio realizados nas sementes crioconservadas, estão de acordo com os resultados dos testes de germinação, utilizando a concentração de 0,05% e 0,075% de cloreto 2,3,5 trifenil tetrazólio (TTC).

Tabela 3: Teste de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Brenan) crioconservadas e submetidas a descongelamento lento e rápido.

<b>Tratamento</b>	<b>Média (%) de sementes germinadas</b>	<b>IVG*</b>
Controle	89,0 <sup>a</sup>	0,8425 <sup>a</sup>
Crioconservadas e com descongelamento lento	96,0 <sup>a</sup>	0,4975 <sup>b</sup>
Crioconservadas e com descongelamento rápido	97,0 <sup>a</sup>	0,5450 <sup>b</sup>

\*Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Os resultados demonstram a eficiência da crioconservação como método de armazenamento em longo prazo de sementes de *A. colubrina*. Contudo, o processo de germinação das sementes apresentou diferenças no IVG e demonstra que o processo de crioconservação causa alterações nas sementes sem que estas alterações causem danos às mesmas. Foi observado que após um período de quatro dias, os valores para a germinação dos três lotes foi semelhante, havendo diferença somente na velocidade de germinação nas primeiras 48 horas (figura 5), resultado semelhante foi encontrado por Nery (2008) na crioconservação de sementes de *A. colubrina*.

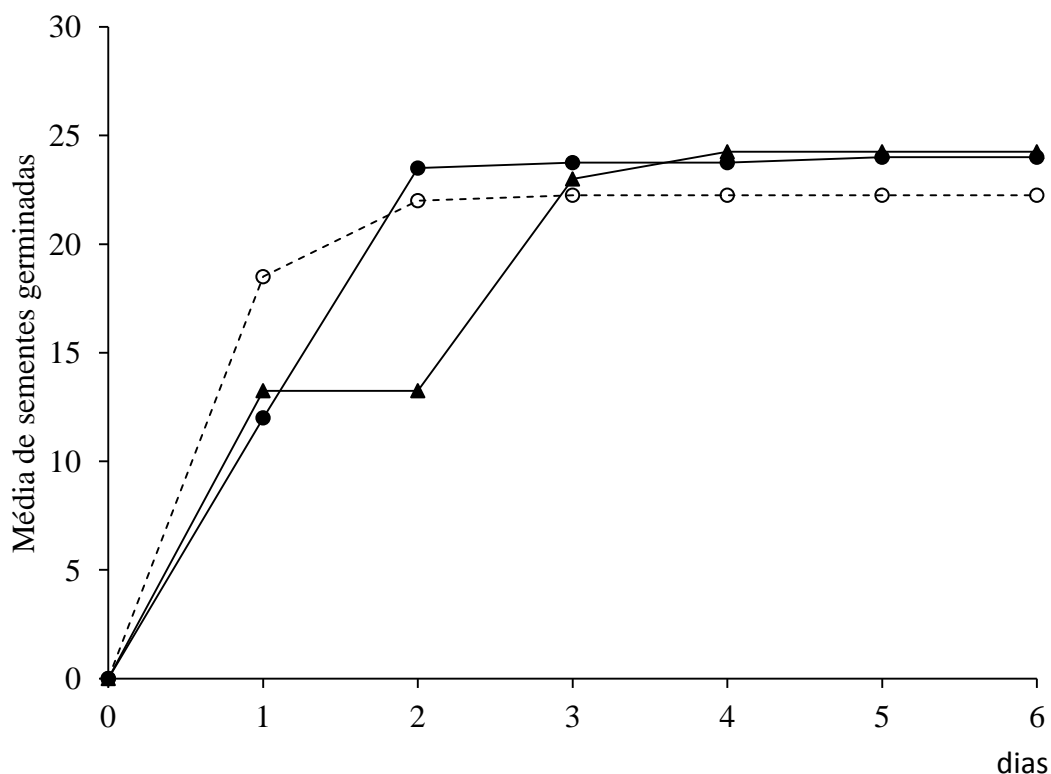


Figura 5: Número médio de sementes germinadas de *Anadenanthera colubrina* (Brenan): não crioconservadas ----○----; crioconservadas com descongelamento lento\_\_●\_\_; crioconservadas com descongelamento rápido \_\_▲\_\_.

Uma possível explicação para a menor velocidade de germinação das sementes crioconservadas é a menor taxa de embebição das sementes crioconservadas (dados verificados pela autora, mas não divulgados por falta de análise estatística), o que sugere a necessidade de estudos mais detalhados a respeito da fisiologia das sementes de *A. colubrina*.

## CONCLUSÕES

O teste do tetrazólio é uma metodologia eficiente para o monitoramento do armazenamento de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Brenan); a incubação das sementes em concentrações de 0,05% e 0,075% de tetrazólio por 18 ou 24 horas é eficaz para a coloração e identificação da viabilidade das sementes dessa espécie; a imersão direta das sementes de *A. colubrina* em nitrogênio líquido não causa danos fisiológicos às sementes, independente do método de descongelamento, mantendo a viabilidade das sementes.

## REFERÊNCIAS

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília. 2009.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica; Colombo,PR: Embrapa Florestas, v.1 1ª Ed. 2003.p.91-97.

FERREIRA, G.F. e BORGHETTI, F.(orgs). **Germinação – Do básico ao aplicado**. São Paulo. Artmed Editora. 323p. 2004.

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

MARQUES, M.A. **Secagem e armazenamento de sementes de *Anadenanthera peregrina* var. *falcata* (Benth.) Altschul e *A. colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul**. 2007. 124p. Tese (Doutorado em Agronomia)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

MENDES, M.A.S.; BASTOS, A.A.; MELO, M.G.G. Padronização do teste de tetrazólio em sementes de *Parkia velutina* Benoist (Leguminosae – Mimosoideae). **Acta Amazônica**. v.39(4), p.823-828. 2009.

MONTEIRO,J.M.; NETO, E.M.F.L.; AMORIM, E.L.C.; STRATTMANN, R.R.; ARAÚJO, E.L.; ALBUQUERQUE, U.P. Teor de taninos em três espécies simpátricas da caatinga. **Revista Árvore**. v.29 (6). 2005.

MOREIRA, J.N.; ALMEIDA, C.F. ALBUQUERQUE, U.P.; LUCENA, R.F.P.; FLORENTINO, A.T.N. e OLIVEIRA, R.L.C. *Use and traditional management of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan in the semi-arid region of northeastern Brazil*. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. v2 :(6). 2006.

MORETÃO, M.P.; BUCHI, D.F.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M.B.M.; Effect of na acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. **Immunology Letters**. v.89: p.175-185.(2003).

NERY, F.C. **Germinação, cultivo in vitro e tolerância ao congelamento de sementes de Angico vermelho (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan)**. 2008. 215p. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal de Lavras – MG.

SANTOS, I.R.I. **Crioconservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal**. VII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. 1999. Brasília-DF.

WOOD, C.B.; MILES, S.; RIX, C.; TERRY, J.; DAWS, M.I. The effect of seed oil content on viability assessment using tetrazolium: a case study using 171 species. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v.143, p.17-23, 2005.

ZAR, J.H. 1999. **Biostatistical analysis**. 4 ed. Prentice Hall, New Jersey. 929p.

ZONTA, J.B.; SOUZA, L.T.; DIAS, D.C.F.S.; ALVARENGA, E.M. Comparação de metodologias do teste de tetrazólio para sementes de cafeeiro. **IDESIA**, v.27, n° 2, p. 17-23, 2009.

## **CAPÍTULO 2**

### **CRIOCONSERVAÇÃO DE CALOS DE *Anadenanthera colubrina* (VELLOSO) BRENAN.**

**CRIOCONSERVAÇÃO DE CALOS DE *Anadenanthera colubrina* (VELLOSO)  
BRENAN.**

Ferraz, M.<sup>1\*</sup>; Santos, S.A.<sup>1</sup>; Oliveira, L.M.<sup>1</sup>; Santana, J.R.F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Avenida Transnordestina, S/N, Novo Horizonte, CEP: 44.036.900, Feira de Santana-Bahia, Brasil. [\\*marisolfz.ferraz@gmail.com](mailto:marisolfz.ferraz@gmail.com)

**RESUMO** - *Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan é uma espécie arbórea da família Mimosoideae com grande potencial econômico, em virtude da sua madeira apresentar alta resistência e pela produção de resina em sua casca, rica em compostos bioativos. A utilização intensa da espécie tem demandado a necessidade de conservação do seu germoplasma. O objetivo geral do presente trabalho foi ajustar uma metodologia para a criopreservação de calos desta espécie. Foram utilizadas sementes que se encontravam armazenadas no banco de sementes do Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) que, inicialmente, foram desinfestadas e germinadas em placa de petri. Depois de germinadas estas foram utilizadas como fonte de explantes para o estabelecimento de culturas primárias *in vitro*. A partir destas culturas foram extraídos segmentos internodais que foram inoculados em meio de cultura WPM suplementado com reguladores de crescimento para indução de calos. Os calos obtidos passaram por dois métodos de conservação: vitrificação e encapsulamento/desidratação. Os calos encapsulados foram imersos ainda em sacarose, glicerol ou DMSO, para a crioproteção das células. Finalmente os calos foram imersos em nitrogênio líquido, a -196°C por 24h. Ao final de cada etapa os calos foram submetidos ao teste de viabilidade celular. A técnica de encapsulamento/desidratação com a utilização da sacarose como crioprotetor foi o melhor pré-tratamento para a criopreservação de calos de *A. colubrina*.

**Palavras chave:** Calo, recursos genéticos vegetais, crioproteção, encapsulamento.

**ABSTRACT** - *Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan is a tree of the family Mimosoideae with great economic potential, due to its high resistance wood and for the production of resin in its bark, rich in bioactive compounds. The intensive use of the



species has demanded the need for conservation of their germplasm. The overall objective of this study was to fit a methodology for the cryopreservation of callus of this species. We used seeds that were stored in the seed bank of the Horto Florestal da Universidade Estadual of Feira de Santana (UEFS) that initially were sterilized and germinated in petri dishes. Once germinated these were used as explant source for establishing primary cultures in vitro. From these cultures were extracted internodal segments were inoculated on WPM supplemented with growth regulators for callus induction. The calli obtained through two conservation methodologies: vitrification and encapsulation / dehydration. The encapsulated calli were still immersed in sucrose, glycerol or DMSO for the cryoprotection of cells. Finally calli were immersed in liquid nitrogen at -196 ° C for 24h. At the end of each stage calli were tested for cell viability. The encapsulation technique / dehydration with sucrose as a cryoprotectant was the best pre-treatment for the cryopreservation of *A. colubrina* callus.

**Keywords:** Callus, plant genetic resources, cryoprotection, encapsulation.

## INTRODUÇÃO

*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan é uma espécie arbórea, pertencente à família Leguminosae – Mimosoideae, e está entre o grupo das espécies de grande importância para o enriquecimento da região semiárida do Brasil (NEPOMUCENO et al., 2009). Trata-se de um vegetal de grande valor econômico e que apresenta diversas formas de utilização, podendo ser explorada desde a sua madeira, suas folhas, e até a sua resina, rica em compostos bioativos (COSTA et al, 2002). Em virtude de tantas formas de utilização, tem-se verificado um aumento indiscriminado na sua exploração, tornando-se necessário o desenvolvimento de formas alternativas para a sua exploração e conservação (NEPOMUCENO et al., 2009).

Fatores naturais e a ação antrópica, como incêndios, desmatamentos, expansão agrícola e o crescente desenvolvimento das cidades e áreas industriais tem contribuído para a perda de espécies silvestres e dos recursos fitogenéticos, muitos cujas potencialidades sequer foram identificadas (SOUZA et al, 2009). Para Medeiros e Cavallari (1992), com o objetivo de se garantir a sobrevivência de certas espécies por diversas gerações, tornam-se

necessários estudos buscando-se a padronização de metodologias para conservação do germoplasma por longo prazo, tendo em vista a manutenção da variabilidade genética da espécie.

Para tanto, a conservação *ex situ* tem sido a metodologia mais indicada, sobretudo em função dos elevados custos para manutenção de populações naturais. Entre as formas de conservação *ex situ* destaca-se a manutenção de coleções em condições de campo ou em casa de vegetação, sementes em câmaras frias com umidade controlada. Tecidos ou órgãos vegetais podem ser conservados via cultura de tecidos *in vitro*, ou ainda através da crioconservação, que segundo Kartha (1985) é a conservação do material biológico em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  ou na sua fase de vapor a  $-150^{\circ}\text{C}$ . Apesar da cultivo *in vitro* ser a técnica mais difundida e utilizada para espécies de grande valor econômico (SOUZA *et al.*, 2009), a técnica de crioconservação apresenta maiores benefícios, como baixo custo, menores riscos de perda do material biológico e a possibilidade de conservação por vários anos (SANTOS, 2001).

Teoricamente podem ser crioconservados diversos tipos de materiais biológicos, como sementes, protoplastos, suspensões celulares, calos, gemas, entre outros. O calo é uma massa de células não diferenciada de proliferação descontínua (HAYASHI *et al.* 2002). Essa massa celular pode ser adquirida a partir de vários órgãos, principalmente de tecido meristemático, que após a desdiferenciação e formação do calo podem se rediferenciar em raiz, broto ou embriões somáticos (GOLLE, 2010). A crioconservação mantém inalterada a capacidade de proliferação e de “germinação” do embrião somático, o que permite a conservação de linhagens celulares intactas, sem que haja o risco de variação somaclonal (LAMBARDI e BENELI, 2007). Contudo, a capacidade de sobrevivência de cada tecido vegetal durante a crioconservação depende da sua tolerância à desidratação e à temperatura no nitrogênio líquido (SANTOS, 2000).

Na crioconservação a integridade das membranas celulares é determinante para o sucesso do procedimento em cada etapa do processo. A grande quantidade de água no interior das células no momento o ultra-resfriamento pode levar a formação de cristais de gelo que causam danos às membranas, sendo outra causa possível de danos a membranas celulares é a desidratação excessiva. Evidências sugerem ainda que durante a crioconservação podem ocorrer mudanças na composição lipídica das membranas, alterando a organização das membranas e contribuindo para a perda das suas funções, como permeabilidade, compartimentalização e/ou atividade enzimática, levando as células

à morte (SANTOS, 2000).

Apesar dos calos serem ótimos explantes para a crioconservação, em virtude da sua capacidade proliferativa e regenerativa, apresenta como dificuldade ou limitação o elevado conteúdo de água nas suas células, o que leva à formação de cristais de gelo intracelular e consequente dano às estruturas celulares. Para evitar a formação de cristais de gelo, são utilizadas substâncias crioprotetoras, que protegem os explantes dos danos causados pelo ultra-resfriamento. Entre as substâncias mais utilizadas como crioprotetoras estão o glicerol, o dimetilsulfóxido (DMSO), o etilenoglicol, o açúcar e a sacarose (LAMBARDI e BENELI, 2007). Graças as suas propriedades coligativas, estas substâncias abaixam a temperatura de congelamento e protegem a célula dos danos da desidratação, evitando a contração excessiva do protoplasto. Glicerol e DMSO agem ainda como antioxidantes, capturando radicais livres que possam ser formados durante o congelamento. Estas substâncias atuam como crioprotetores na vitrificação e no encapsulamento/desidratação e sua utilização em altas concentrações leva a uma desidratação severa do citosol com a formação de um estado de alta viscosidade que possui temperatura de solidificação extremamente baixa (LAMBARDI e BENELI, 2007).

O termo vitrificação refere-se ao processo físico de transição de uma solução aquosa para um estado sólido amorfo (não cristalino), durante o ultra-resfriamento rápido (FAHY *et al*, 1984). A vitrificação do citoplasma celular previne a formação cristais de gelo intracelular e, portanto, órgãos e tecidos vegetais submetidos à vitrificação podem se manter íntegros à temperatura do nitrogênio líquido, sendo capazes de regenerar plantas via cultivo *in vitro*.

A técnica de encapsulamento/desidratação é derivada da tecnologia das sementes sintéticas, onde o explante, constituído de gemas axilares, apicais ou porções de calo embriogênico, é envolto em uma cápsula de alginato de sódio que, em seguida, passam por desidratação em fluxo laminar ou em sílica, sendo posteriormente congelados. Uma das vantagens do encapsulamento/desidratação é a possibilidade da realização de pré-tratamentos com crioprotetores e a adição de nutrientes e reguladores que possam estimular o brotamento ou enraizamento do explante na recuperação em cultivo *in vitro* após o descongelamento (LAMBARDI E BENELI, 2007).

Assim, o objetivo deste trabalho foi testar dois métodos de crioconservação, vitrificação e encapsulamento/desidratação, e o pré-tratamento com três crioprotetores (sacarose, glicerol e DMSO) no encapsulamento/desidratação de calos de *A. colubrina*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

Os ensaios foram desenvolvidos nos Laboratórios de Germinação e de Cultura de Tecidos Vegetais da Unidade Experimentais Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana-BA. Foram utilizadas sementes provenientes de matrizes localizadas no município de Juaí, Petrolina-PE, colhidas entre agosto e setembro de 2010. Estas foram acondicionadas em sacos de algodão conservadas em refrigerador (5-10°C).

### Obtenção dos calos

As sementes foram inicialmente lavadas em água de torneira e posteriormente desinfestadas em câmara de fluxo laminar, via imersão em álcool a 70% durante um minuto e em seguida em solução de hipoclorito de sódio [NaOCl a 2,5% de cloro ativo] com duas gotas de detergente neutro, durante 10 minutos. Por fim, foram lavadas quatro vezes em água destilada. Para o estabelecimento *in vitro*, após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em placas de petri forradas com duas folhas de papel germitest®, previamente autoclavadas. Após a inoculação as placas foram fechadas e vedadas com filme de Poli Cloreto de Vinila (PVC) e colocadas em sala de crescimento com temperatura de  $25\pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Após a emissão da radícula as sementes foram transferidas para tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 15 ml de meio de cultura WPM (Wood Plant Médium), elaborado por LLOYD & McCOWN (1980), suplementado com 10% de sacarose e 0,7% de ágar, pH  $5,7\pm 0,1$  e autoclavado. Após a inoculação os tubos foram fechados com tampas plásticas e mantidos em sala de crescimento nas mesmas condições descritas anteriormente. Após o desenvolvimento da plântula (15 dias), os segmentos internodais foram inoculados em meio WPM solidificado com 0,7% de ágar e suplementado com 10% de sacarose,  $17,76 \mu\text{M}$  de BAP (6-Benzilaminopurina) e  $42,96 \mu\text{M}$  de ANA (ácido naftalenoacético), combinação de reguladores mais favorável ao desenvolvimento dos calos de *A. colubrina* (dados não publicados). Após inoculação os tubos foram vedados com filme PVC e mantidos no escuro e temperatura de  $25\pm 2^\circ\text{C}$  por 45 dias, quando os calos já desenvolvidos foram repicados ou submetidos à criopreservação.

## **Vitrificação**

Regiões mais claras dos calos foram cortadas em pedaços de aproximadamente 2 mm (etapa A) e incubados em meio MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962) líquido, suplementado com 0,4M de sacarose com pH 5,8 e mantidos por 1h sob agitação em agitador horizontal a 70 rpm (etapa B). Após o tempo de incubação o meio foi drenado e substituído para a solução de saturação, meio MS líquido suplementado com 0,4M de sacarose e 2,0M de glicerol, pH 5,8 e mantido sob agitação em agitador horizontal por uma hora (etapa C). Em seguida, as amostras foram transferidas para solução PVS2 (Plant vitrification solution 2) (Sakay, 1990), composta por meio MS acrescido de 30% de glicerol (w/v), 15% de etilenoglicol (w/v), 15% de DMSO (w/v) e 0,4M de sacarose, pH 5,8 esterilizado por filtração em filtro milipore 30 $\mu$ m e mantidas por 5 minutos (etapa D), sendo, então transferidas para tubo eppendorff com capacidade de 1,5 ml com nova solução PVS2, vedados com parafilme e mergulhados em nitrogênio líquido a -196°C. Após 24h os calos foram retirados do NL, descongelados rapidamente por imersão em banho-maria a 40° C por 5 min (etapa E). Depois do descongelamento o PVS2 foi rapidamente substituído por meio MS líquido contendo 1,2M de sacarose, pH 5,8, sendo trocado a cada dez minutos, duas vezes antes de ser transferido para meio MS líquido por dez minutos. Como controle do processo de crioconservação a cada etapa foram retiradas amostras e submetidas a teste de viabilidade com teste de tetrazólio (cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazolio) a 0,5% por um período de 24h a 25°C. Os experimentos foram realizados em quatro repetições de quinze amostras por tratamento e analisados segundo uma ANOVA e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

## **Encapsulamento/desidratação**

Para o encapsulamento amostras de calo (etapa A) foram transferidas para solução de alginato de sódio e, em seguida, ‘gotejadas’ em solução 0,1M de CaCl<sub>2</sub> para a formação das cápsulas (etapa B). Os calos encapsulados foram transferidos para meio de cultura MS líquido, suplementado com diferentes crioprotetores: 1) 0,4M de sacarose, 2) 30% de glicerol (w/v), 3) 15% de DMSO (w/v) por 18 horas sob agitação constante de 70 rpm em agitador horizontal (etapa C). Após o período de incubação com os crioprotetores os calos encapsulados foram retirados da solução crioprotetora, lavados com água destilada e o excesso de água retirado com papel absorvente e dessecados em sílica gel em caixa gerbox fechada por 1h (etapa D), em seguida transferidos para tubo Eppendorf lacrados com

parafilme e congelados em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Após 24h em nitrogênio líquido, os calos foram descongelados rapidamente em banho-maria a  $40^{\circ}\text{C}$  por 5min. E em seguida as cápsulas foram reidratadas em meio MS por uma hora antes da coloração com tetrazólio (etapa E). Como controle do processo e avaliação da viabilidade celular, a cada etapa foi retirada amostras e submetidas à coloração com tetrazólio. Como controle de células mortas, não reativas ao tetrazólio portanto, foram utilizados calos fervidos por 5 minutos. Após a análise foi realizado o registro fotográfico das amostras com câmara marca SONY modelo  $\alpha 290$ . Os experimentos foram realizados em quatro repetições de quinze amostras por tratamento e analisados segundo uma ANOVA e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

### **Teste de viabilidade**

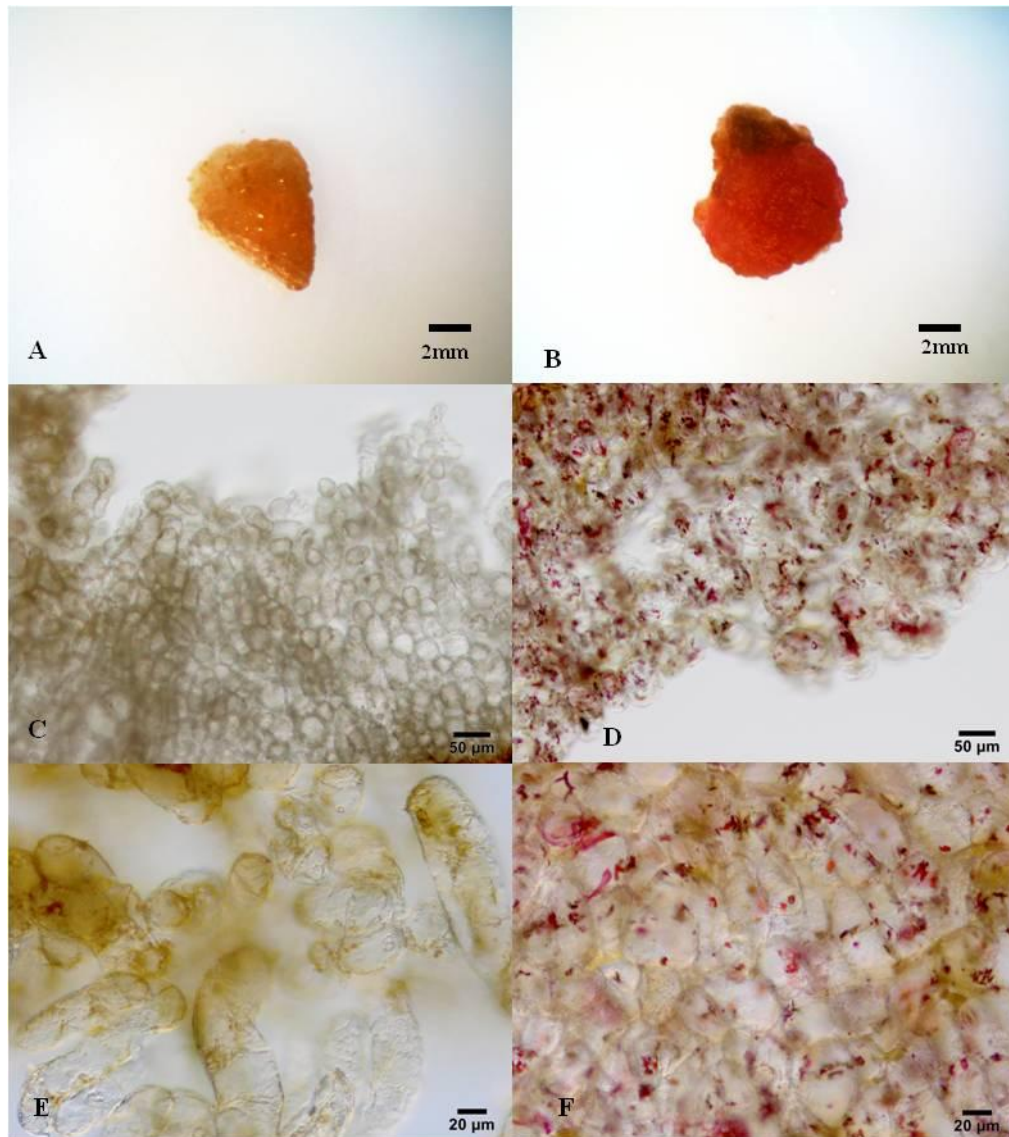
As amostras de calos foram submetidos à incubação com cloreto de 2,3,5 trifetil tetrazólio a 0,5%, a  $25^{\circ}\text{C}$  por 24 horas no escuro. Como controle negativo (células mortas), foi utilizado calo previamente submerso em água fervente por cinco minutos. A fim de confirmar o acúmulo de formazan no interior das células foram preparadas lâminas com cortes de calos, obtidos manualmente após emblocamento em parafina. A observação da viabilidade celular foi visual, realizada mediante comparação de cor com controle (células mortas), e utilizando-se microscópio estereoscópico SKOPE TRILOCULAR ZOOM e fotos feitas com câmera digital SCOPE TEK DCM 310 ou microscópio ótico de transmissão OLYMPUS CBB. As fotomicrografias foram obtidas com fotomicroscópio OLYMPUS BX 60.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

De fundamental importância para o sucesso da crioconservação é a manutenção da viabilidade celular durante o processo e, para o seu controle, a cada etapa da metodologia empregada neste trabalho, amostras foram retiradas e submetidas ao teste de tetrazólio. Os testes preliminares realizados mostraram que a concentração de 0,5% de cloreto de 2,3,5 trifetil tetrazólio, por incubação de 24 horas a  $25^{\circ}\text{C}$  é eficiente na identificação de células viáveis e não viáveis (Figura 1, anexo 2). Assim, durante todas as etapas do processo de crioconservação foram retiradas amostras e submetidas ao teste de tetrazólio nessas condições para a avaliação da viabilidade celular.

Os resultados obtidos demonstraram que na crioconservação de calos de

*A. colubrina*, a vitrificação não se mostrou uma técnica eficiente, pois foi verificada uma queda na viabilidade celular a cada etapa do processo, com somente 1,66% de viabilidade após o descongelamento dos calos (Tabela 1).



**Figura 1:** Calos de *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan, corados com cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio a 0,5% por 24h, a 25°C. A, C e E - Controle – células mortas; B, D e F - calo viável. A e B – obtidos por microscópio estereoscópico Skope Trilocular Zoom. C, D, E e F - obtidos em microscópio ótico de transmissão OLYMPUS CBB.

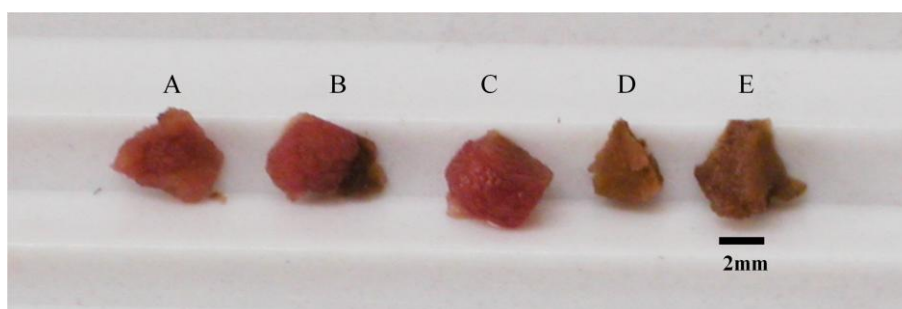
Não houve dano significativo às células durante o pré-tratamento com sacarose a 0,4M por uma hora, com a viabilidade celular semelhante à observada nos calos sem tratamento. Foi observada uma perda de viabilidade de 11,86% depois da incubação com a solução de saturação (sacarose 0,4M e glicerol 30% w/v) por uma hora, quando comparada com a viabilidade dos calos sem nenhum tratamento. Contudo verificou-se uma queda abrupta depois da incubação com a solução PVS2 e perda de viabilidade (1,66%) após criopreservação e descongelamento (Tabela 1 e Figura 1).

**Tabela 1:** Percentagem média de calos de *A. colubrina* viáveis a cada etapa da criopreservação. Encapsulamento/ desidratação: A - calos sem encapsulamento; B - calos encapsulados em alginato de sódio; C - calos encapsulados após incubação com crioprotetores; D - após desidratação em sílica gel e E - calos encapsulados após descongelamento. Vitrificação: A- calos isolados sem tratamento; B- pré-tratamento com 0,4M sacarose; C - crioproteção com 0,4M de sacarose + 2,0M de glicerol; D - tratados com PVS2 e E - após o descongelamento.

Etapas da criopreservação					
Encapsulamento					
Crioprotetores	A	B	C	D	E
Sacarose 0,4M	100,0 <sup>a</sup>	100,0 <sup>a</sup>	85,0 <sup>a</sup>	76,67 <sup>b</sup>	40,0 <sup>c</sup>
Glicerol 30%	100,0 <sup>a</sup>	98,33 <sup>b</sup>	82,67 <sup>b</sup>	7,75 <sup>c</sup>	25,0 <sup>d</sup>
DMSO 15%	100,0 <sup>a</sup>	98,33 <sup>a</sup>	44,47 <sup>ab</sup>	1,66 <sup>b</sup>	0,0 <sup>b</sup>
Vitrificação					
	A	B	C	D	E
	98,33a	95,0ab	86,67b	40,0 <sup>c</sup>	1,66 <sup>c</sup>

Médias seguidas por diferentes letras nas linhas são estatisticamente diferentes pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.





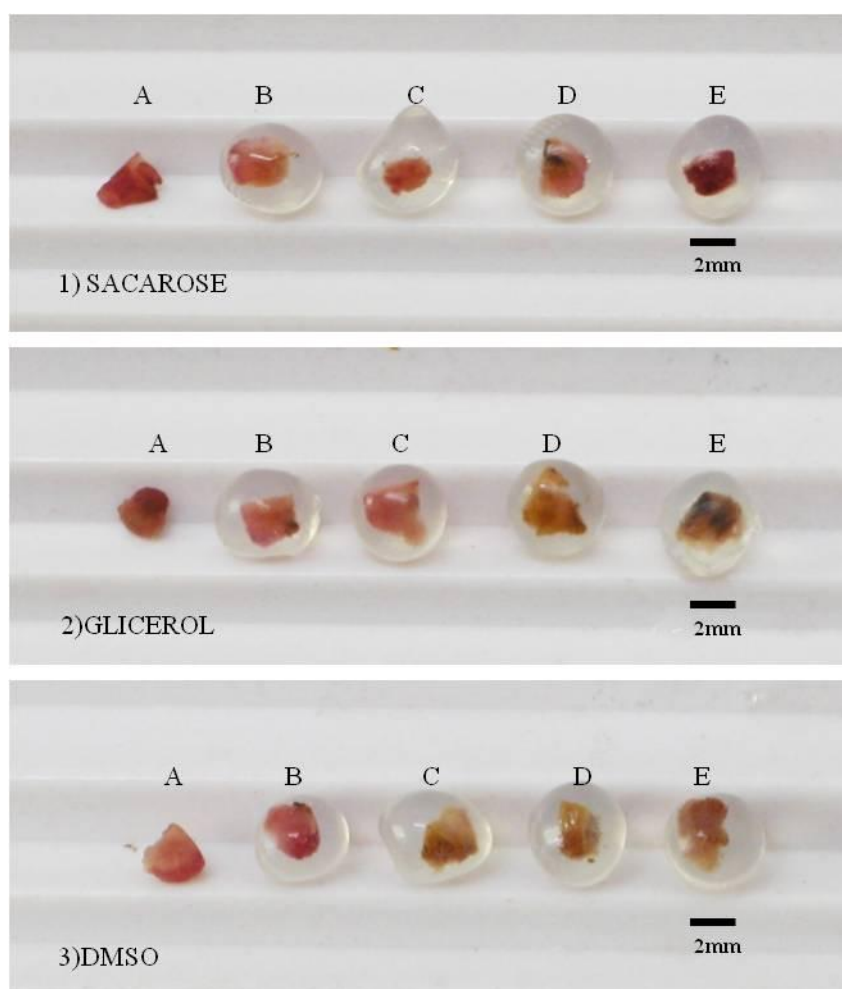
**Figura 2** – Teste de tetrazólio de calos de *A. colubrina*, utilizando-se concentração de 0,5%, a 25°C por 24h, para controle da viabilidade celular durante o processo de vitrificação: A - calos isolados sem tratamento; B – após o pré-tratamento com 0,4M de sacarose; C – após crioproteção com 0,4M de sacarose + 2,0M de glicerol por 1h; D – após tratamento com PVS2 e E - após descongelamento.

A redução da viabilidade durante a incubação com a solução de saturação pode ser explicada pelo estresse causado pela manipulação somada à alteração de osmolaridade causada pelas altas concentrações de sacarose e glicerol, que são utilizados com o intuito de diminuir o teor de água no ambiente celular. Já a perda de viabilidade devido à toxicidade do PVS2 foi relatada para outras espécies, como no trabalho realizado por Matsumoto et al. (2004), com calos de *Dimocarpus longan* (Sapindaceae), no qual mesmo com a utilização de metade da concentração de PVS2 verificou-se perda severa de viabilidade dos calos. PVS2 é uma solução concentrada constituída de três crioprotetores, glicerol, etilenoglicol e DMSO, que causam uma osmodesidratação das células do explante, entretanto, o tempo de exposição ao PVS2, suficiente para fornecer proteção ao nitrogênio líquido sem que venha a ser tóxico para as células, é bastante difícil de ser determinada (LAMBARDI e BENELI, 2007).

Para a metodologia utilizando encapsulamento/desidratação foram testados três crioprotetores, sacarose, glicerol e DMSO no pré-tratamento dos explantes após o encapsulamento em alginato de sódio. Os resultados obtidos demonstram que o pré-tratamento com sacarose a 0,75M foi o mais eficiente, no qual a viabilidade final dos calos após o descongelamento foi de 40%, menor que a observada com o pré-tratamento com glicerol a 30% w/v, em que se obteve a viabilidade final de 25% dos calos criopreservados. A menor taxa de viabilidade foi obtida com o pré-tratamento com

DMSO, onde a viabilidade dos calos foi zero (Tabela 1).

Os resultados obtidos demonstram que a utilização de sacarose é o tratamento mais promissor para a desidratação celular e proteção das membranas celulares dos calos de *A. colubrina* (Figura 3). A sacarose é um redutor osmótico e sua utilização visa diminuir o teor de água do ambiente celular, sendo isenta de citotoxicidade mesmo quando em altas concentrações no citoplasma celular (SANTOS, 2000). A sacarose apresenta grande



**Figura 3** – Teste de viabilidade dos calos de *A. colubrina* nas diferentes etapas do encapsulamento-desidratação e incubados em solução de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazolio (TTC), a 0,5% durante 24h: A - calos sem encapsulamento; B - calos encapsulados em alginato de sódio; C- calos encapsulados após incubação com crioprotetores (tratamento 1 - 0,4M sacarose; tratamento 2 - 30% glicerol e tratamento 3 - 15% DMSO); D - após dessecação em sílica gel e E - calos encapsulados após descongelamento.

eficiência na estabilização das membranas celulares durante o congelamento, podendo agir como agente osmótico externo, removendo o excesso de água intracelular através de gradiente osmótico ou substituindo a água removida das biomoléculas, mantendo as estruturas hidrofílicas mesmo depois da remoção da água (SANTOS, 2000). A sacarose pode, desta forma, fornecer proteção às membranas celulares, mantendo sua integridade e em consequência, mantendo a viabilidade celular durante o período de desidratação das cápsulas e durante o ultra-resfriamento dos calos encapsulados. Matsumoto *et al.* (2004), trabalhando com calos de *Dimocarpus longan* (Sapindaceae) observaram que a maior taxa de regeneração dos calos foi obtido em meio contendo alta concentração de sacarose.

Por outro lado, nos calos encapsulados após o pré-tratamento com glicerol e crioconservados verificou-se uma queda na viabilidade celular em comparação com o pré-tratamento com sacarose, sendo que após o descongelamento e ao final do processo somente 25% dos calos continuaram viáveis. Embora o glicerol faça parte da composição natural das membranas celulares e tenha ação na estabilização das membranas durante a desidratação celular, bem como ação antioxidante (LAMBARDI e BENETTI, 2007), já foi relatado que o mesmo pode afetar eventos físicos no citoplasma levando a dano celular irreversível (CASTRO *et al.*, 2011). A queda da viabilidade dos calos que receberam tratamento com glicerol foi mais acentuada na etapa de desidratação das cápsulas e na etapa de crioconservação, o que demonstra que este tratamento não se mostrou eficaz para promover a proteção adequada às membranas celulares (Figura 3).

Já com o pré-tratamento com DMSO, nenhum dos calos crioconservados manteve a viabilidade (Tabela 1 e Figura 3). A coloração com tetrazólio feita nas etapas de controle do processo demonstrou a perda de viabilidade completa já na etapa de crioproteção com DMSO, antes da etapa de desidratação e crioconservação (Figura 3). O DMSO altera a permeabilidade das membranas e tem sido usado como agente crioprotetor, mas sua metabolização gera subprodutos potencialmente tóxicos para a célula (CASTRO *et al.*, 2011). Esta alteração de permeabilidade pode explicar a baixa viabilidade encontrada nos calos submetidos ao pré-tratamento com este crioprotetor, além de que, sua eficiência pode variar de acordo com a estrutura da célula ou tecido, concentração e tempo de exposição.

Para Melo (2008), entre as técnicas de pré-tratamento já descritas para a crioconservação de tecidos vegetais, o encapsulamento-desidratação apresenta diversas vantagens, como fácil manuseio dos explantes, armazenamento de grande quantidade de tecidos delicados, além de poder ser utilizado crioprotetores não tóxicos, como o verificado

com a sacarose nesse trabalho.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a possibilidade conservação de calos de *A. colubrina*, em nitrogênio líquido; que o encapsulamento/desidratação é um método eficiente para a conservação de calos dessa espécie; que o pré-tratamento com sacarose é o mais promissor em relação à manutenção da viabilidade dos calos; que maiores estudos são necessários a fim de aumentar a viabilidade dos calos após o descongelamento, bem como desenvolver um protocolo de regeneração dos calos garantindo, deste modo, a utilização dessa metodologia para a conservação genética da espécie.

## REFERÊNCIAS

- CASTRO, S.V; CARVALHO, A. A; SILVA, C.M. G; FAUSTINO, L. R; FIGUEREDO, J. R; RODRIGUES, A.P.R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, 39(2): 957, 2011.
- COSTA, J. A. S; NUNES, S. T; FERREIRA, A. P. L; STRADMANN, M. T. S; QUEIROZ, L. P. **Leguminosas forrageiras da caatinga: Espécies importantes para as comunidades rurais do Sertão da Bahia**. 2 ed. Feira de Santana, BA: Editora Sasop, 2002.
- FAHY, G.M.; MACFARLANE, D.R.; ANGELL, C.A. e MERYMAN, H.T. Vitrification as na approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v.21; p. 407-426, 1984.
- GOLLE, D.P. 2010. **Estabelecimento, multiplicação, calogênese, organogênese in vitro e análise da diversidade genética em acessos de *Eugenia involucrata* DC**. Disponível em <  
[http://www.vsdani.com/ppgef/tesesdissertacoes/cd019diego\\_pascoal\\_golle\\_tese\\_de\\_doutorado.pdf](http://www.vsdani.com/ppgef/tesesdissertacoes/cd019diego_pascoal_golle_tese_de_doutorado.pdf) > Acesso em 04 abril 2011.
- HAYASHI, T. K; MOREIRA, A; AMARAL, A. F. D. C; MELO, M. 2002. Tratamento de Matrizes de Cravo (*Dianthus caryophyllus* L, *caryophyllaceae*) com nitrogênio e calogênese *in vitro*). **Scientia Agricola**, v.59, n.1, p.47-52, 2002.

- KARTHA, K.K. Meristem culture and germplasm preservation. In: Kartha, K.K. (Ed.) **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1985. pp. 115-134.
- LLOYD, G. & MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**. v.15(3):p.416. 1980.
- LAMBARDI, M. e BENELLI, C. La crioconservazione per la tutela del germoplasma delle specie arboree. **Fruticoltura**. n°6, p. 34-39. 2007.
- MATSUMOTO, K; HAHARJO, S. R. T; DHEKNEY, S; MOON, P. A; LITZS, R. E. Crioconservação e embriogênese somática de calos de *Dimocarpus longan*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol. 39, n. 12, p. 1262-1263, 2004.
- MEDEIROS, A. D. DE S; CAVALLARI, D. A. N. Conservação de Germoplasma de Aroeira (*Astronium urundeuva* (FR. ALL.) Engl. I. Germinação de sementes após imersão em Nitrogênio líquido (-196°C). **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 14, n. 1, p. 73-75, 1992.
- MELO, C. G. 2008. **Crioconservação de Germoplasma de Cana-de-açúcar**. Disponível em < [http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde\\_arquivos/22/TDE-2009-07-01T133647Z-1737 / Publico/texto%20completo.pdf#page=8](http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde_arquivos/22/TDE-2009-07-01T133647Z-1737 / Publico/texto%20completo.pdf#page=8) > Acesso em 25 fev 2012.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. v.15, p. 473-467. 1962.
- NEPOMUCENO, C.F.; RIOS, A.P.S.; QUEIROZ, S.R.O.D.; PELACANI, C.R.; SANTANA, J.R.F. Respostas morfofisiológicas in vitro de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul. **Revista Árvore**. v.33 (3), p.481-490, 2009.
- SANTOS, I.R.I. Crioconservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v.12 (edição especial): p.70-84, 2000.
- SOUZA, A. D. S; SOUZA, F. V. D; SEREJO, J. A. D .S; JUNGHANS, T. G; PAZ, O. P. D; MONTARROYOS, A. V. V; SANTOS, V. D. S; MORAIS, L. S. Preservação de germoplasma vegetal, com ênfase na conservação in vitro de variedades de mandioca. **Embrapa**, Cruz das Almas- BA, p. 2-23, 2009.

## **CAPÍTULO 3**

### **CRIOCONSERVAÇÃO DE GEMAS APICAIS E AXILARES DE *ANADENANTHERA COLUBRINA* (VELLOSO) BRENAN.**

## **CRIOCONSERVAÇÃO DE GEMAS APICAIS E AXILARES DE *ANADENANTHERA COLUBRINA* (VELLOSO) BRENAN.**

Ferraz, M.<sup>1\*</sup>; Santos, S.A.<sup>1</sup>; Oliveira, L.M.<sup>1</sup>; Santana, J.R.F<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Avenida Transnordestina, S/N, Novo Horizonte, CEP: 44.036.900, Feira de Santana-Bahia, Brasil. [\\*marisolfz.ferraz@gmail.com](mailto:marisolfz.ferraz@gmail.com)

**RESUMO** - *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan possui grande potencial econômico, por produzir madeira de boa qualidade, grande quantidade de resina em sua casca e diversos compostos bioativos de interesse da indústria química e farmacêutica. A utilização intensa da espécie tem demandado a necessidade de conservação do seu germoplasma. O objetivo geral do presente trabalho foi ajustar uma metodologia para a criopreservação de gemas apicais e axilares desta espécie. Foram utilizadas sementes que se encontravam armazenadas no banco de sementes do Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) que, inicialmente, foram desinfestadas e germinadas em placa de petri. Depois de germinadas estas foram utilizadas como fonte de explantes para o estabelecimento de culturas primárias in vitro. Os explantes obtidos passaram por dois métodos de conservação: vitrificação e encapsulamento/desidratação. As gemas encapsuladas foram pré-tratadas em sacarose, glicerol ou DMSO, para a crioproteção das células. Finalmente os explantes foram imersos em nitrogênio líquido (-196°C) por 10 dias. Após o descongelamento os explantes foram inoculados em meio WPM para avaliação da viabilidade. A técnica de encapsulamento/desidratação com a utilização da sacarose como crioprotetor foi o melhor pré-tratamento para a criopreservação de gemas apicais e axilares de *A. colubrina*.

**Palavras chave:** recursos genéticos vegetais, crioproteção, encapsulamento.

**ABSTRACT** - *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan has great economic potential for producing good quality wood, lots of resin in its bark and several bioactive compounds of interest to the chemical and pharmaceutical industry. The intensive use of the species has demanded the need for conservation of their germplasm. The overall objective of this

study was to fit a methodology for the apical and axillary buds cryopreservation of this species. We used seeds that were stored in the seed bank of the Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) that initially were sterilized and germinated in petri dishes. Once germinated these were used as explant source for establishing primary cultures *in vitro*. The explants obtained passed by two conservation methods: vitrification and encapsulation / dehydration. The encapsulated buds were pretreated with sucrose, glycerol or DMSO for cryoprotection of cells. Finally the explants were immersed in liquid nitrogen (-196 ° C) for 10 days. After thawing the explants were inoculated in WPM medium for viability assessment. The encapsulation technique / dehydration with sucrose as a cryoprotectant were the best pre-treatment for the cryopreservation of *A. colubrina* apical and axillary buds.

**Keywords:** plant genetic resources, cryoprotection, encapsulation.

## INTRODUÇÃO

*Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan, família Mimosaceae, é conhecida vulgarmente como angico (LORENZI, 2002) e muito utilizada na medicina popular como expectorante e antidiarréico. Além de fornecer madeira de boa qualidade produz goma-resina em quantidade que pode ser usada na indústria química e ainda por ser uma espécie primária ou secundária sucessional é excelente nas ações de recomposição ambiental (CARVALHO, 2003). A diminuição das populações naturais em decorrência da ocupação territorial e da exploração desordenada dos recursos naturais tem levado à erosão genética de muitas espécies, perda da variabilidade e conseqüente extinção de genótipos e espécies (Brooks et al, 2002), o que tem colocado a conservação dos recursos genéticos como uma necessidade premente.

As espécies podem ser preservadas *in situ*, entretanto, essa forma de conservação necessita de grandes áreas de terra, tem altos custos de manejo e o germoplasma fica suscetível a stress ambiental, como pestes e doenças e, por conseqüência, o germoplasma pode ser facilmente perdido (WALTER, CAVALCANTI e BIANCHETTI, 2007). Uma alternativa a esse tipo de preservação é a conservação *ex situ*, onde as espécies são diretamente manejadas pelo ser humano e devem ser aplicados métodos apropriados de coleta e conservação do germoplasma. Nessa forma de conservação as coleções podem, por exemplo, ser mantidas em bancos de germoplasma, casas de vegetação ou através do cultivo *in vitro*. Contudo, coleções *in vitro* estabelecidas para algumas espécies com



propagação vegetativa e mantidas através da micropropagação tradicional, também são muito trabalhosas e sempre há risco de perda de acessos por contaminação, erro humano ou variação somaclonal, i.e., mutações que ocorrem espontaneamente em cultura de tecidos e cuja frequência aumenta com a repetição de subcultivos (WITHERS e WILLIAMS, 1998).

Uma alternativa a essas formas de conservação é o armazenamento de sementes, embriões e tecidos vegetais em nitrogênio líquido, a  $-196^{\circ}\text{C}$ , conhecido como criopreservação. Nesse método, órgãos reprodutivos e vegetativos de utilização clássica na micropropagação, como anteras, embriões, gemas axilares e apicais podem ser utilizados, garantindo-se alta fidelidade genética em relação ao cultivar ao qual pertence, com menor custo, entretanto, como são tecidos com grande quantidade de água é necessária a desidratação prévia dos explantes, o que pode ser feito com a utilização de soluções crioprotetoras, que reduzem os danos causados pelo ultra-resfriamento (LAMBARDI E BENELLI, 2007). Entre as substâncias mais utilizadas para esse fim estão o glicerol e o dimetilsulfóxido (DMSO), que graças às suas propriedades coligativas, abaixam a temperatura de congelamento de uma solução, limitando a formação de cristais de gelo e protegendo as células dos danos causados pela desidratação, reduzindo a concentração dos solutos celulares e a contração excessiva do protoplasto. Possuem ainda a capacidade de absorver os radicais livres que podem ser formados pelo ultrarresfriamento rápido (LAMBARDI e BENELLI, 2007).

Açúcares como a sacarose, trealose e glicose também têm sido utilizados como substâncias crioprotetoras, pois são excelentes agentes vitrificadores, não apresentam toxicidade para os tecidos vegetais e mostram alta eficiência na estabilização das membranas celulares durante o congelamento (SANTOS, 2000). Para a vitrificação também tem sido comum a utilização da solução PVS2 (Plant Vitrification Solution), que é uma mistura concentrada de crioprotetores: glicerol, DMSO, etilenoglicol e sacarose.

A vitrificação do citoplasma celular previne a formação de cristais de gelo intracelular e, portanto, órgãos e tecidos vegetais submetidos à vitrificação podem ser mantidos íntegros à temperatura do nitrogênio líquido, sendo capazes de regenerar plantas via cultivo *in vitro*.

Outra técnica que tem sido utilizada para a criopreservação de tecidos vegetais é o encapsulamento/desidratação. Nesse processo o explante é protegido em matriz de alginato

de sódio, passando por posterior desidratação em fluxo laminar ou em sílica gel. Como o alginato é permeável à água, a realização de pré-tratamento ou pré-incubação em soluções crioprotetoras é de fácil execução.

Na criopreservação de gemas, tanto apicais como axilares, estas devem estar desprovidas dos primórdios foliares mais externos, para favorecer o tratamento na solução crioprotetora e quando são de dimensões muito pequenas, podem permanecer com uma parte do segmento nodal (SAKAY e ENGELMANN, 2007).

Uma grande vantagem dessa técnica é que gemas e segmentos nodais podem ser inclusos na cápsula de alginato de sódio antes de passar por tratamento com solução crioprotetora, podendo ainda ser adicionados ao alginato nutrientes e reguladores que possam estimular o brotamento ou enraizamento do explante na recuperação em cultivo *in vitro* após o descongelamento (LAMBARDI E BENELI, 2007).

Várias espécies de interesse comercial e agrícola já foram criopreservadas pela utilização de gemas apicais ou axilares como explante, tanto com a metodologia de vitrificação como encapsulamento/desidratação, como *Prunus domestica* (BAGNIOL E ENGELMANN, 1991), *Allium sativum* (MAKOWSKA *et al*, 1999), *Manihot* spp. (CHAROENSUB *et al*, 1999), *Solanum* spp. FABRE e DEREUDDRE, 1990).

Diante do exposto, objetivou-se com esse trabalho ajustar metodologias para a criopreservação de gemas apicais e axilares de *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan, utilizando-se os métodos de vitrificação e encapsulamento/desidratação.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal**

Os ensaios foram desenvolvidos nos Laboratórios de Germinação e de Cultura de Tecidos Vegetais da Unidade Experimentais Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana-BA. Foram utilizadas sementes provenientes de matrizes localizadas no município de Juaí, Petrolina-PE, colhidas entre agosto e setembro de 2010. Estas foram acondicionadas em sacos de algodão e conservadas em refrigerador (5-10°C).

### **Obtenção dos explantes**

As sementes foram inicialmente lavadas em água de torneira e posteriormente

desinfestadas em câmara de fluxo laminar, via imersão em álcool a 70% durante um minuto e em seguida em solução de hipoclorito de sódio [NaOCl a 2,5% de cloro ativo] com duas gotas de detergente neutro, durante 10 minutos. Por fim, foram lavadas quatro vezes em água destilada. Para o estabelecimento *in vitro*, após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em placas de petri forradas com duas folhas de papel germitest®, previamente autoclavadas. Após a inoculação as placas foram fechadas e vedadas com filme de Poli Cloreto de Vinila (PVC) e colocadas em sala de crescimento com temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas, densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos  $40\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ . Após a emissão da radícula as sementes foram transferidas para tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 15 ml de meio de cultura WPM (Wood Plant Medium), elaborado por LLOYD & McCOWN (1980), suplementado com sacarose (29,21mM), solidificado com ágar (0,7%) e pH ajustado para  $5,8 \pm 0,1$  antes da autoclavagem. Após a inoculação os tubos foram fechados com tampas plásticas e mantidos em sala de crescimento nas mesmas condições descritas anteriormente. Após o desenvolvimento das plântulas (15 dias), estas foram utilizadas para a obtenção dos explantes (gemas apicais e axilares) para a crioconservação, sendo testados dois métodos: vitrificação e encapsulamento/desidratação.

### **Vitrificação**

As gemas apicais e axilares excisadas (etapa A) foram incubados em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) líquido, pH  $5,8\pm 0,1$  suplementado com 0,4M de sacarose, mantidas sob agitação em agitador horizontal a 70 rpm (etapa B). Após uma hora de incubação o meio foi drenado e substituído pela solução de saturação, constituída de meio MS líquido, suplementado com 0,4M de sacarose e 2,0M de glicerol, pH 5,8, onde os explantes foram mantidos sob agitação em agitador horizontal por uma hora (etapa C). Em seguida, as amostras foram transferidas para solução PVS2 (Plant vitrification solution 2) (Sakay, 1990), composta por meio MS líquido acrescido de 30% de glicerol (w/v), 15% de etilenoglicol (w/v), 15% de DMSO (w/v) e 0,4M de sacarose, pH  $5,8\pm 0,1$ , esterilizado por filtração em filtro milipore  $30\mu\text{m}$  e mantidas por 5 minutos, sendo, então, transferidas para tubo eppendorff com capacidade de 1,5 ml com nova solução PVS2(etapa D), vedados com parafilme e mergulhados em nitrogênio líquido (NL) a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Após período de mínimo de dez dias de congelamento, as amostras foram retiradas do NL, descongeladas rapidamente por imersão em banho-maria a  $40^{\circ}\text{C}$  por 5 min. Depois

do descongelamento o PVS2 foi rapidamente substituído por meio MS líquido contendo 1,2M de sacarose, pH  $5,8 \pm 0,1$ , sendo trocado a cada dez minutos, duas vezes e transferidas para o meio de recuperação (etapa E). Finalmente as amostras foram inoculadas em tubo de ensaio contendo 15 ml de meio WPM acrescido com sacarose (29,21mM), solidificado com ágar (0,7%) e pH  $5,8 \pm 0,1$ , para a recuperação dos explantes. Como controle do processo e avaliação da viabilidade celular, a cada etapa foram retiradas amostras e inoculadas em meio de cultura WPM na mesma composição. As amostras foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

A viabilidade foi quantificada pela manutenção do explante em cultivo, sendo consideradas viáveis as amostras que permaneceram com a coloração verde e/ou iniciaram brotamento, oxidadas aquelas que apresentaram escurecimento dos tecidos e início da formação de calo e inviáveis os explantes mortos. As avaliações foram realizadas aos sete, quatorze e vinte e um dias de cultivo. Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de quinze amostras cada e analisados segundo uma ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

### **Encapsulamento/desidratação**

Para o encapsulamento as gemas apicais e axilares (etapa A) foram transferidas para solução de alginato de sódio e, em seguida, ‘gotejadas’ em solução 0,1M de  $\text{CaCl}_2$  para a formação das cápsulas (etapa B). As gemas encapsuladas foram transferidas para meio de cultura MS líquido, suplementado com diferentes crioprotetores: 1) 0,4M de sacarose, 2) 30% de glicerol (w/v) ou 3) 15% de DMSO (w/v) mantidas por 18 horas sob agitação constante de 70 rpm em agitador horizontal quando foram retiradas da solução crioprotetora, lavadas com água destilada e o excesso de água retirado com papel absorvente (etapa C) e dessecadas em sílica gel em caixa gerbox fechada por 1h (etapa D), em seguida transferidos para tubo Eppendorf lacrados com parafilme e congelados em nitrogênio líquido, a  $-196^\circ\text{C}$ . Posteriormente, as gemas foram descongeladas rapidamente em banho-maria a  $40^\circ\text{C}$  por 5min e, em seguida, as cápsulas foram reidratadas em meio MS por uma hora (etapa E) antes inoculação em tubo de ensaio contendo 15 ml de meio WPM acrescido com sacarose (29,21mM), solidificado com ágar (0,7%) e pH ajustado para  $5,8 \pm 0,1$ , para a recuperação dos explantes. Como controle do processo e avaliação da

viabilidade celular, a cada etapa foi retirada três amostras por repetição e inoculadas em meio WPM na mesma composição, mantidas em sala de crescimento com temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas, umidade relativa de 50-70% e densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A viabilidade foi quantificada pela manutenção do explante em cultivo, sendo consideradas viáveis as amostras que permaneceram com a coloração verde e/ou iniciaram brotamento, oxidadas aquelas que apresentaram escurecimento dos tecidos e início da formação de calo (Figura 1) e inviáveis os explantes mortos. As avaliações foram realizadas a cada sete dias, aos sete, quatorze e vinte e um dias de cultivo.

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições de quinze amostras cada e analisados segundo uma ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que na crioconservação de gemas apicais e axilares de *A. colubrina*, a técnica da vitrificação, não se mostrou eficiente, pois foi verificada uma queda na viabilidade com a formação de calos em parte das gemas crioconservadas e a não recuperação de plantas estabelecidas. Houve perda de 82,22% das gemas apicais e 88,87% das gemas laterais crioconservadas após 21 dias do descongelamento; apenas 6,67% das gemas apicais e 11,13% das gemas laterais (tabela 1, anexo 3), iniciaram uma calogênese espontânea e aqui foram denominados de ‘explante oxidado’ para fins de avaliação.

Durante o tempo do cultivo *in vitro*, muitos explantes sofreram oxidação e subsequente calogênese. Este processo de oxidação é resultado da produção de componentes fenólicos pelos explantes, o que causa o escurecimento dos mesmos (GHAFOORI et al, 2012) sendo que, frequentemente, esse processo é observado nos primeiros estágios do cultivo de *A. colubrina* o que leva a formação de calos de modo espontâneo, sem a utilização de reguladores. O desenvolvimento de calos no cultivo *in vitro* de *A. colubrina* foi relatado por Nery (2008), sendo mais elevado em cultivo em meio WPM que em meio MS, mesmo na ausência de regulador de crescimento.

Quando avaliadas as etapas da crioconservação por vitrificação observou-se que não houve dano significativo nas primeiras etapas: explante sem tratamento (A), e pré-tratamento com 0,4M sacarose (B); e uma queda acentuada após a etapa C (saturação com

0,4M de sacarose + 2,0M de glicerol) e uma segunda queda significativa da viabilidade na etapa D (incubação com PVS2) (Tabela 2). Após 21 dias de cultivo *in vitro*, houve o desenvolvimento de calos em 22,33% e 11,0% das gemas apicais e laterais na etapa D do

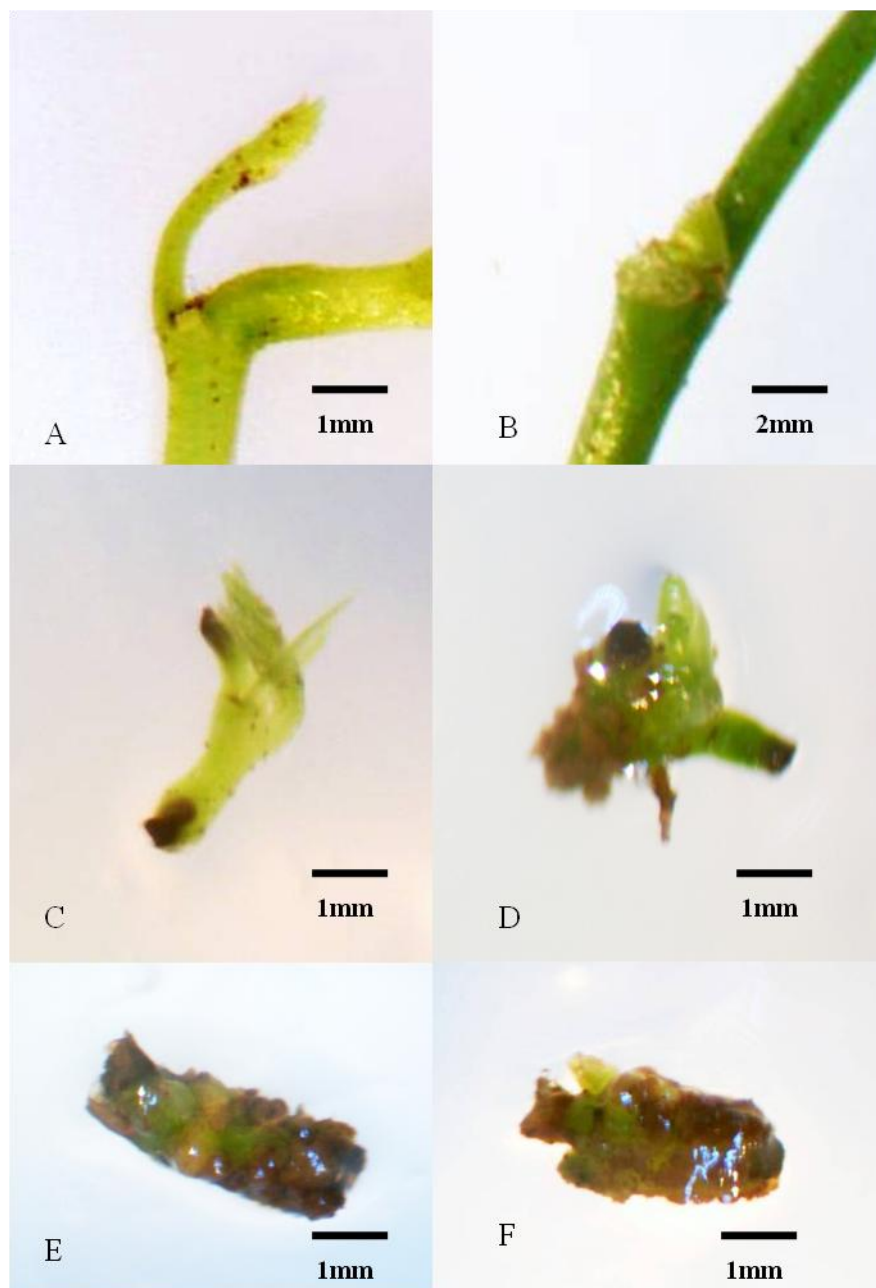


Figura 1: *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan: A- Gema apical de, B- gema axilar, C – gema apical viável, D- Gema axilar com início de brotamento e formação de calo, E - gema apical oxidada com início de formação de calo e F- gema axilar com início de formação de calo. Fotografias obtidas por microscópio estereoscópico Skope Trilocular Zoom.

controle (incubação com PVS2), respectivamente, o que sugere uma ação oxidante da solução de vitrificação sobre os explantes, demonstrado pela oxidação e formação de calos tanto nas amostras crioconservadas como nas amostras controle expostas ao PVS2. Segundo Sakay e Engelman (2007), os explantes devem ser suficientemente desidratados pela solução de vitrificação sem causar injúria ao tecido antes do congelamento sendo que, para esses autores, a chave para o sucesso da crioconservação está na quantificação da tolerância à desidratação das amostras a serem crioconservadas na solução PVS2.

Tabela 1: Percentagem média de gemas apicais e axilares *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan viáveis, oxidados e inviáveis após vitrificação, crioconservação, descongelamento e reinoculação in vitro.

Gema apical			
	7° dias	14° dias	21° dias
Viáveis	64,47 <sup>a</sup>	17,73 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>
Oxidados	33,33 <sup>b</sup>	73,33 <sup>a</sup>	6,67 <sup>b</sup>
Inviáveis	0 <sup>c</sup>	6,67 <sup>c</sup>	82,22 <sup>a</sup>
Gema axilar			
	7° dias	14° dias	21° dias
Viáveis	60,0 <sup>a</sup>	8,87 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>
Oxidadas	33,33 <sup>b</sup>	53,33 <sup>a</sup>	11,13 <sup>b</sup>
Inviáveis	0 <sup>c</sup>	31,13 <sup>b</sup>	88,87 <sup>a</sup>

Médias seguidas por diferentes letras nas colunas são estatisticamente diferentes pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Para a metodologia utilizando encapsulamento/desidratação foram testados três crioprotetores, sacarose, glicerol e DMSO no pré-tratamento dos explantes após o encapsulamento em alginato de sódio. Os resultados obtidos demonstram que os pré-tratamentos de sacarose a 0,75M e Glicerol a 2,0M foram os mais eficientes que o pré-tratamento com DMSO (Tabela 3). Com a sacarose como crioprotetor no encapsulamento/desidratação verificou-se sobrevivência de 33,33% e 37,80% das gemas apicais e axilares respectivamente, oxidadas e com início de calogênese (Tabela 3), após 21 dias do descongelamento, pouco menor que os índices de formação de calos observados nos controles pré-tratados com sacarose (etapa D) após 21 dias de cultivo (Tabela 4) . Com

o pré-tratamento com glicerol 28,26% das gemas apicais e 20,0% das gemas axilares crioconservadas apresentaram oxidação dos tecidos e desenvolvimento de calos após 21 dias de cultivo após descongelamento. A menor taxa de viabilidade foi obtida com o pré-tratamento com DMSO, onde a viabilidade das amostras foi zero no mesmo período de avaliação (Tabela 3).

Tabela 2: Controle da crioconservação por vitrificação de gemas apicais e axilares de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan aos 21 dias de cultivo: viáveis (V), oxidadas (OX) e inviáveis (INV) a cada etapa da vitrificação: A - gemas isoladas sem tratamento; B – após pré-tratamento com 0,4M sacarose; C – após saturação com 0,4M de sacarose + 2,0M de glicerol; D – após tratamento com PVS<sub>2</sub>.

Etapas	Gema apical			Gema axilar		
	V	OX	INV	V	OX	INV
A	11,00	44,33	44,33 <sup>ab</sup>	11,0	44,33 <sup>ab</sup>	44,33 <sup>ab</sup>
B	22,33	55,67	22,33 <sup>b</sup>	0,0	66,67 <sup>a</sup>	33,33 <sup>b</sup>
C	11,00	33,33	55,67 <sup>ab</sup>	11,0	44,33 <sup>ab</sup>	44,33 <sup>ab</sup>
D	0,0	22,33	77,67 <sup>a</sup>	0,0	11,0 <sup>b</sup>	88,67 <sup>a</sup>

Médias seguidas por diferentes letras nas colunas são estatisticamente diferentes pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Segundo Santos (2000), a sacarose possui alto potencial redutor e sua utilização em concentrações elevadas diminui o teor de água do ambiente celular, além de ser isenta de citotoxicidade. Por conta disso, apresenta grande eficiência na estabilização das membranas celulares durante o congelamento, podendo agir como agente osmótico externo, removendo o excesso de água intracelular através de gradiente osmótico ou substituindo a água removida das biomoléculas, mantendo as estruturas hidrofílicas mesmo depois da remoção da água, o que explica os resultados obtidos nesse trabalho. Para Engelmann *et al*, (2010), gemas apicais e axilares oriundas de cultivo *in vitro* estão sujeitas a uma série de estágios de condicionamento que podem causar sérios danos ao material encapsulado.

A análise das etapas de controle do encapsulamento/desidratação com pré-tratamento com glicerol resultam em 22,33% das gemas axilares oxidadas, iniciando a for-



mação de calo e desenvolvimento de uma brotação com tamanho máximo de 1,0 cm ao final de 21 dias de cultivo *in vitro*. 44,33% das gemas apicais e axilares da etapa de controle D (após pré-tratamento) desenvolveram calos, taxa bem mais alta que aquelas encontradas após a criopreservação, o que mostra que a ação crioprotetora do glicerol não se mostrou muito eficaz para gemas apicais e axilares de *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan.

Tabela 3: Percentagem média gemas apicais e gemas axilares de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, criopreservadas após o encapsulamento/desidratação e pré-tratamento com sacarose, glicerol e DMSO: viáveis (V), oxidadas (OX) e inviáveis (INV) após a criopreservação, descongelamento e 21 dias de cultivo *in vitro*.

	Gema apical			Gema axilar		
	V	OX	INV	V	OX	INV
Sacarose	0	33,33 <sup>a</sup>	66,67 <sup>b</sup>	0	37,80 <sup>a</sup>	57,80 <sup>b</sup>
Glicerol	0	28,26 <sup>a</sup>	71,13 <sup>b</sup>	0	20,0 <sup>b</sup>	73,33 <sup>ab</sup>
DMSO	0	0 <sup>b</sup>	100,0 <sup>a</sup>	0	0 <sup>c</sup>	88,86 <sup>a</sup>

Médias seguidas por diferentes letras nas colunas são estatisticamente diferentes pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Dos crioprotetores utilizados, o DMSO mostrou-se ineficiente na crioproteção dos explantes submetidos ao ultra-resfriamento, visto que 100% das amostras criopreservadas (Tabela 3), perderam a viabilidade e na etapa D; 88,87% das gemas apicais e 89,0% das gemas laterais (Tabela 4) eram inviáveis após 21 dias de cultivo e somente 11,0% das amostras incubadas com DMSO desenvolveram calos, índice bem menor que o alcançado nos pré-tratamentos com sacarose e glicerol. Este resultado pode ser explicado pela elevada toxicidade do DMSO, pois este altera a permeabilidade das membranas, facilitando o processo de desidratação celular, mas sua metabolização pode gerar subprodutos tóxicos a célula (CASTRO *et al*, 2011). Além disso, na sua utilização é necessário alcançar o equilíbrio perfeito entre concentração e tempo de incubação a fim de garantir a sobrevivência dos explantes (SAKAY e ENGELMANN, 2007).

Tabela 4: Controle das etapas da crioconservação por encapsulamento/desidratação, com pré-tratamentos com sacarose, glicerol e DMSO. Percentagem média de gemas apicais e axilares de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan viáveis (V), oxidadas (OX) e inviáveis (INV) após 21 dias de cultivo *in vitro*. Etapas: A - gemas sem encapsulamento; B - gemas encapsuladas em alginato de sódio; C - gemas encapsuladas após incubação com crioprotetores; D - após dessecação em sílica gel.

Gema apical									
sacarose			glicerol			DMSO			
A	V	OX	INV	V	OX	INV	V	OX	INV
B	22,33	33,33	44,33 <sup>ab</sup>	0,0	66,67	33,33	22,33	44,33	33,33
C	33,33	55,67	11,0 <sup>b</sup>	22,33	33,33	44,33	11,0	44,33	44,33
D	22,33	44,33	33,33 <sup>ab</sup>	22,33	33,33	44,33	0,0	33,33	66,67
	0,0	44,33	55,67 <sup>a</sup>	22,33	44,33	33,33	0,0	11,0	88,67

Gema axilar									
sacarose			glicerol			DMSO			
	V	OX	INV	V	OX	INV	V	OX	INV
A	22,33	44,33	33,33	11,0	55,67	33,33	11,0	55,67	33,33 <sup>b</sup>
B	44,33	44,33	11,00	11,0	44,33	44,33	11,0	44,33	44,33 <sup>b</sup>
C	22,33	44,33	33,33	22,33	55,67	44,33	0,0	44,33	55,67 <sup>ab</sup>
D	22,33	44,33	33,33	22,33	44,33	33,33	0,0	11,0	89,0 <sup>a</sup>

\*Médias seguidas por diferentes letras nas colunas são estatisticamente diferentes pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a possibilidade de crioconservação de gemas apicais e axilares de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. A sacarose tem maior eficiência na crioproteção dos explantes, mas nenhum dos métodos utilizados para a crioconservação se mostrou eficaz na recuperação direta das gemas apicais e axilares dessa espécie. O encapsulamento/desidratação, utilizando-se pré-tratamentos com sacarose e glicerol, foi capaz de impedir a morte das células dos explantes, entretanto, o processo leva à oxidação das gemas e consequente formação de calos. Apesar dos avanços, verifica-se a necessidade do refinamento da metodologia, ajus-

tando a concentração dos crioprotetores e o tempo de incubação, buscando-se causar menos estresse ao material, diminuir a oxidação dos explantes e a formação de calos além do desenvolvimento de metodologia para a regeneração dos explantes.

## REFERÊNCIAS

BAGNIOL, S.; ENGELMANN, F.; Effects of pregrowth and freezing conditions on the resistance of meristems of date (*Phoenix dactylifera* L. var. Bou Sthammi Noir) to freezing in liquid nitrogen. **CryoLetters**. v.12. p.279-286, 1991.

BROOKS, T.M.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; RYLANDS, A.B.; KONSTANT, W.R.; FLICK, P.; PILGRIM, S.; OLDFIELD, S.; MAGIN G. e HILTON-TAYLOR. Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. **Conservation biology**. 16(4): p.909-923. 2002.

CALDAS, L.S.; HARIDASON, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. & BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/EMBRAPA, v.1. 1998. p. 87-132.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, v.1 1ª Ed. 2003.p.91-97.

CASTRO, S.V; CARVALHO, A. A; SILVA, C.M. G; FAUSTINO, L. R; FIGUEREDO, J. R; RODRIGUES, A.P.R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, 39(2): 957, 2011.

CHAROENSUB, R.; PHANSIRI, S.; SAKAY, A.; YONGMA-NICTCHAI, W.; Cryopreservation of cassava in vitro grown shoot tips cooled to -196° by vitrification. **CryoLetters**. v.20, p.89-94, 1999.

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

ENGELMANN, F.; Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular Developmental Biology –Plant**. –Plant. Invited review, 2010.

FABRE, J. e DEREUDRE, J. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. **CryoLetters**. v.11, p.413-426, 1990.

- GHAFOORI, R.; BERNARD, F.; ABOLMAALI, S.; e MOUSAVI, A. Improved effect of glutathione on the induction and growth of *Taxus baccata* L. callus. **Annals of Biological Research**. v.3, n°4, p.1726-1730, 2012.
- LAMBARDI, M. e BENELLI, C. La crioconservazione per la tutela del germoplasma delle specie arboree. **Fruticoltura**. n°6, p. 34-39. 2007.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, v.1. 4ª Ed. 2002. p.188.
- MAKOWSKA, Z.; KELLER, J.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of apices isolated from garlic (*Allium sativum* L.) bulbils and cloves. **CryoLetters**. v.20, p.175-182, 1999
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. v.15, p. 473-467. 1962.
- NERY, F.C. **Germinação, cultivo in vitro e tolerância ao congelamento de sementes de Angico vermelho (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan)**. 2008. 215p.Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal de Lavras – MG.
- SAKAY, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus senensis* Osb. var.brasiliensis Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**. v.9, p.30-33, 1990.
- SAKAY, A.; ENGELMANN, F.; Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. **CryoLetters**. v.28, n°3, p.151-172, 2007.
- SANTOS, I.R.I. Crioconservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 12 (edição especial): 70-84, 2000.
- WALTER, B.M.T.; CAVALCANTI, T. B.; BIANCHETTI, L.B. Princípios sobre coleta de germoplasma vegetal. In NASS, L.L. **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p.194-229.
- WITHERS, L.A.; WILLIAMS, J.T. Conservação in vitro de recursos genéticos de plantas in TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. & BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/EMBRAPA, v.1. 1998. p. 297-330.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O teste do tetrazólio é uma metodologia eficiente para o monitoramento do armazenamento de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Brenan) e a incubação das sementes em concentrações de 0,05% e 0,075% de tetrazólio por 18 ou 24 horas é eficaz para a coloração e identificação da viabilidade das sementes dessa espécie.

A criopreservação das sementes *A. colubrina* por imersão direta em nitrogênio líquido não causa danos fisiológicos às sementes, independente do método de descongelamento, mantendo a viabilidade e o vigor, sendo uma alternativa viável para a conservação genética da espécie.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a possibilidade de conservação de calos de *A. colubrina*, em nitrogênio líquido; por meio do método de encapsulamento/desidratação e o pré-tratamento com sacarose é o mais promissor em relação à manutenção da viabilidade dos calos dessa espécie.

Na criopreservação de gemas apicais e axilares, novamente a sacarose teve uma eficiência maior na crioproteção dos explantes, mas nenhum dos métodos utilizados para a criopreservação se mostrou eficaz na recuperação direta das gemas apicais e axilares de *A. colubrina*, com o desenvolvimento de brotos e diferenciação de raízes. O encapsulamento/desidratação com os pré-tratamentos de sacarose e glicerol foram capazes de impedir a morte das células dos explantes, porém o processo levou à oxidação das gemas e consequente formação de calos.

É necessário o refinamento da metodologia, ajustes da concentração dos crioprotetores e tempos de incubação, na tentativa de causar menos estresse ao material, diminuir a oxidação dos explantes e a formação de calos. Testar o uso de reguladores de crescimento para a obtenção da regeneração direta das plantas. Experimentos de organogênese e a embriogênese somática de *A. colubrina* podem fornecer uma alternativa para a recuperação dos explantes criopreservados desta espécie, mas também carecem de estudos mais detalhados.

## ANEXOS

ANEXO 1:

Tabela A: Umidade Relativa (%U.R.) das sementes de *A.colubrina* ano 2010 obtido pelo método da estufa. Média de quatro repetições com 25 sementes

	Peso inicial (Pi)	Peso final (Pf)	Pi-Pf	(Pi-Pf)/Pi	(Pi-Pf)/Pi*100
R1	2,882	2,668	0,214	0,0743	7,4254
R2	3,067	2,843	0,224	0,0730	7,3036
R3	2,845	2,639	0,206	0,0724	7,2408
R4	2,923	2,728	0,224	0,0766	7,6634
				média	7,4083 %U.R.

Tabela B: Umidade Relativa (%U.R.) das sementes de *A.colubrina* ano 2008 obtido pelo método da estufa. Média de quatro repetições com 25 sementes.

	Peso inicial (Pi)	Peso final (Pf)	Pi-Pf	(Pi-Pf)/Pi	(Pi-Pf)/Pi*100
R1	3,086	2,8480	0,2380	0,0771	7,7122
R2	3,06	2,822	0,2380	0,0778	7,7778
R3	3,017	2,795	0,2220	0,0736	7,3583
R4	3,076	2,849	0,2380	0,0774	7,7373
				média	7,6464

Tabela C: Resultado das Análises de variância em função do tempo de incubação e concentração de TTC de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Brenan)

Coloração sementes viáveis e vigorosas						
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
T	5	3737.500000	747.500000	18.559	0.0000	
R	3	170.833333	56.944444	1.414	0.2777	
erro	15	604.166667	40.277778			
Total corrigido		23	4512.500000			
Média geral:		CV (%) =	10.80	Número de observações:	24	
		58.7500000				
Coloração de sementes inviáveis e pouco vigorosas						
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
T	5	3737.500000	747.500000	18.559	0.0000	
R	3	170.833333	56.944444	1.414	0.2777	
erro	15	604.166667	40.277778			
Total corrigido		23	4512.500000			
Média geral:		CV (%) =	15.39	Número de observações:	24	
		41.2500000				

Tabela D. Resultado das Análises de variância do teste de germinação, primeira contagem e velocidade de germinação sementes de *Anadenanthera colubrina* (Brenan)crioconservadas e não crioconservadas.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA						
germinação de sementes crioconservadas e não crioconservadas.						
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
TRAT	2	9.500000	4.750000	1.819	0.2170	
erro	9	23.500000	2.611111			
Total corrigido		11	33.000000			
Média geral:		CV (%) = 23.500000	6.88	Número de observações:	12	
Primeira contagem de germinação.						
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
TRAT	2	95.166667	47.583333	8.969	0.0072	
erro	9	47.750000	5.305556			
Total corrigido		11	142.916667			
Média geral:		CV (%) = 14.583333	15.79	Número de observações:	12	
IGV DE SEMENTES CRIOPRESERVADAS						
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
T	2	0.279717	0.139858	9.113	0.0152	
R	3	0.016967	0.005656	0.369	0.7789	
erro	6	0.092083	0.015347			
Total corrigido		11	0.388767			
Média geral:		CV (%) = 0.628333	19.72	Número de observações:	12	



## Anexo 2:

Tabela A. Resultados das Análises de variância para viabilidade dos calos encapsulados de *Anadenanthera colubrina*, determinadas pelo teste de TTC submetidos a pré-tratamento com sacarose, glicerol e DMSO e calos virificados.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA  
sacarose

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
T	4	219.200000	54.800000	117.429	0.0000
R	3	0.150000	0.050000	0.107	0.9544
erro	12	5.600000	0.466667		
Total corrigido		19	224.950000		
Média geral:	CV (%) =	5.67			
	12.0500000	Número de observações:		20	

Glicerol

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
T	4	377.200000	94.300000	235.750	0.0000
R	3	4.200000	1.400000	3.500	0.0496
erro	12	4.800000	0.400000		
Total corrigido		19	386.200000		
Média geral:	CV (%) =	5.91			
	10.7000000	Número de observações:		20	

DMSO

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
T	4	972.300000	243.075000	550.358	0.0000
R	3	0.200000	0.066667	0.151	0.9271
erro	12	5.300000	0.441667		
Total corrigido		19	977.800000		
Média geral:	CV (%) =	10.89			
	6.1000000	Número de observações:		20	

vitrificação

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
T	4	620.700000	155.175000	503.270	0.0000
R	3	6.550000	2.183333	7.081	0.0054
erro	12	3.700000	0.308333		
Total corrigido		19	630.950000		
Média geral:	CV (%) =	5.81			
	9.5500000	Número de observações:		20	

Anexo 3:

Tabela A: Resultados das análises de variância para viabilidade de gemas apicais de Anadenanthera colubrina crioconservadas por vitrificação avaliações do 7°, 14° e 21° dia após descongelamento.

ANÁLISE DE VARIÂNCIA						
Vitrificação Gema apical viabilidade dia 7						
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
T	5	211.111111	42.222222	8.243	0.0026	
R	2	0.111111	0.055556	0.011	0.9892	
erro	10	51.222222	5.122222			
Total corrigido		17	262.444444			
Média geral:		CV (%) = 2.444444	92.59	Número de observações:	18	
Vitrificação Gema apical viabilidade dia 14						
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
T	5	279.777778	55.955556	9.240	0.0016	
R	2	0.111111	0.055556	0.009	0.9909	
erro	10	60.555556	6.055556			
Total corrigido		17	340.444444			
Média geral:		CV (%) = 2.444444	100.67	Número de observações:	18	
Vitrificação Gema apical viabilidade dia 14						
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
T	5	429.111111	85.822222	118.831	0.0000	
R	2	0.111111	0.055556	0.077	0.9265	
erro	10	7.222222	0.722222			
Total corrigido		17	436.444444			
Média geral:		CV (%) = 2.444444	34.77	Número de observações:	18	
Vitrificação Gema axilar viabilidade dia 7						
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
TRAT	5	144.000000	28.800000	18.383	0.0001	
REP	2	0.333333	0.166667	0.106	0.9001	
erro	10	15.666667	1.566667			
Total corrigido		17	160.000000			
Média geral:		CV (%) = 2.333333	53.64	Número de observações:	18	
Vitrificação Gema axilar viabilidade dia 14						
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
TRAT	5	164.666667	32.933333	6.214	0.0071	
REP	2	0.333333	0.166667	0.031	0.9691	
erro	10	53.000000	5.300000			
Total corrigido		17	218.000000			
Média geral:		CV (%) = 2.333333	98.66	Número de observações:	18	

Vitrificação Gema axilar viabilidade dia 21

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	5	366.666667	73.333333	733.333	0.0000
REP	2	0.333333	0.166667	1.667	0.2373
erro	10	1.000000	0.100000		
Total corrigido		17	368.000000		
Média geral:		CV (%) = 2.333333	13.55 Número de observações:		18

Tabela B: Resultados das análises de variância para viabilidade de gemas apicais de Anadenanthera colubrina criopreservadas encapsulamento/desidratação e pré-tratamento com sacarose, glicerol e DMSO.

VIABILIDADE GEMA APICAL ENCAPSULAMENTO - SACAROSE

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.972222	0.324074	1.119	0.3582
REP	2	0.166667	0.083333	0.288	0.7522
DIA	2	19.500000	9.750000	33.658	0.0000
erro	28	8.111111	0.289683		
Total corrigido		35	28.750000		
Média geral:		CV (%) = 1.583333	33.99 Número de observações:		36

VIABILIDADE GEMA APICAL ENCAPSULAMENTO - GLICEROL

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	1.000000	0.333333	1.105	0.3635
REP	2	0.888889	0.444444	1.474	0.2463
DIA	2	20.222222	10.111111	33.526	0.0000
erro	28	8.444444	0.301587		
Total corrigido		35	30.555556		
Média geral:		CV (%) = 1.388889	39.54 Número de observações:		36

VIABILIDADE GEMA APICAL ENCAPSULAMENTO - DMSO

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	12.972222	4.324074	12.243	0.0000
REP	2	0.722222	0.361111	1.022	0.3727
DIA	2	15.388889	7.694444	21.787	0.0000
erro	28	9.888889	0.353175		
Total corrigido		35	38.972222		
Média geral:		CV (%) = 0.972222	61.13 Número de observações:		36

Tabela C: Resultados das análises de variância para viabilidade de gemas axilares de Anadenanthera colubrina crioconservadas encapsulamento/desidratação e pré-tratamento com sacarose, glicerol e DMSO.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

VIABILIDADE GEMA AXILAR ENCAPSULAMENTO - SACAROSE

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	1.555556	0.518519	2.010	0.1353
REP	2	0.055556	0.027778	0.108	0.8983
DIA	2	22.722222	11.361111	44.046	0.0000
erro	28	7.222222	0.257937		
Total corrigido		35	31.555556		
Média geral:		CV (%) = 1.888889	26.89	Número de observações:	36

VIABILIDADE GEMA AXILAR ENCAPSULAMENTO - GLICEROL

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.527778	0.175926	0.568	0.6404
REP	2	0.388889	0.194444	0.628	0.5409
DIA	2	26.722222	13.361111	43.167	0.0000
erro	28	8.666667	0.309524		
Total corrigido		35	36.305556		
Média geral:		CV (%) = 1.638889	33.95	Número de observações:	36

VIABILIDADE GEMA AXILAR ENCAPSULAMENTO - GLICEROL

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	13.194444	4.398148	13.683	0.0000
REP	2	0.388889	0.194444	0.605	0.5531
DIA	2	20.388889	10.194444	31.716	0.0000
erro	28	9.000000	0.321429		
Total corrigido		35	42.972222		
Média geral:		CV (%) = 1.027778	55.16	Número de observações:	36