



MARISA TANIGUCHI SARTO

CULTIVO *in vitro* E CRIOPRESERVAÇÃO DE
Alibertia sp.

LAVRAS – MG

2015

MARISA TANIGUCHI SARTO

CULTIVO *in vitro* E CRIOPRESERVAÇÃO DE *Alibertia sp*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia /Fisiologia Vegetal para a obtenção do Título de Mestre.

Orientadora

Prof^a. Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva

Coorientação

Prof^a. Dra Fernanda Carlota Nery

Dra. Michele Valquíria dos Reis

Dr. Diogo Pedrosa Corrêa da Silva

LAVRAS – MG

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Sarto, Marisa Taniguchi.

Cultivo *in vitro* e criopreservação de *Alibertia sp.* / Marisa
Taniguchi Sarto. – Lavras : UFLA, 2015.

95 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2015.

Orientador(a): Patrícia Duarte de Oliveira Paiva.

Bibliografia.

1. Cultivo in vitro. 2. Criopreservação. 3. Sementes. 4.
Medicinal. 5. Cerrado. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

MARISA TANIGUCHI SARTO

CULTIVO *in vitro* E CRIOPRESERVAÇÃO DE *Alibertia sp*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia /Fisiologia Vegetal para a obtenção do Título de Mestre.

APROVADA em 07 de agosto de 2015,

Prof^ª. Dra Fernanda Carlota Nery UFLA
Dra. Milene Alves de Figueiredo Carvalho EMBRAPA

Prof^ª. Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva
Orientadora

Prof^ª. Dra Fernanda Carlota Nery
Dra. Michele Valquíria dos Reis
Dr. Diogo Pedrosa Corrêa da Silva
Coorientação

LAVRAS – MG

2015

Ofereço a minha mãe e irmãos e, em especial, ao meu amado filho e meu estimado esposo, provas concretas na minha vida, de que sem amor não somos nada.

OFEREÇO

Dedico ao meu pai, esteja onde for sua lembrança é eterna.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por se mostrar presente em todos os momentos da minha vida;

A Universidade Federal de Lavras, ao setor de Fisiologia Vegetal pela oportunidade e a Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

A minha orientadora Prof^a. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, primeiramente por ter aceitado ser a minha orientadora, por toda educação, respeito e paciência, pela confiança e apoio.

Ao Prof. Luciano Coutinho Silva que me recebeu de portas abertas e me conduziu nos meus primeiros passos; por sua atenção, amizade e incentivo.

Aos meus coorientadores Prof^a. Fernanda Carlota Nery, Dr^a. Michele Valquíria dos Reis e Dr. Diogo Pedrosa Corrêa da Silva pela compreensão, pela paciência e contribuições neste trabalho;

A Prof^a. Joelma Pereira por ceder o Laboratório de Ciência dos Alimentos para realização das análises da composição química das sementes.

Ao Prof. Renato Paiva por ceder o LCTP (Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas), para realização dos experimentos.

Ao Sr. Alvaro Joarez pela amizade e atenção, além da gentileza em fornecer o material, sem a sua boa vontade esse trabalho não seria possível.

Aos amigos do LCTP, Júnia, Cecília, Rodrigo Therezan, Fernandinha, Mayara, Lermen, Rodrigo, Diliane, Barbara, Camila, Thalita e Gabrielle pela amizade e carinho.

Aos amigos Ana Cristina, Celismar, Débora Prudente, Dany, Cibele, Rafael, Rafaela e Raphael por todos os ensinamentos, carinho e apoio nos momentos difíceis, por se fazerem também família em minha vida.

A Camila Faria, por sua paciência, seus sorrisos, seus puxões de orelhas e todos os momentos de tristeza e de alegria que passamos juntas.

Aos amigos do NEPAFLOR, especialmente a Drucylla, Angela, Iracema, Clarissa, Rodney, Cinara e Thais pelo carinho e amizade e ao Sr. Luis por toda atenção.

As amigas Débora Domiciano e Roseane Oliveira, grandes incentivadoras, sem o apoio e incentivo delas não haveria esta conquista.

Aos companheiros do setor de Fisiologia Vegetal, Joel, Lena (*in memorian*), Daniella, Barrinha, Tanham, Odorêncio, Roniel, Cleide, Iasminy, Paula Santini, Thais, Paula, Viviane, Dayanara, Fernando, Juliene, Bruno, Adolfo, Fabíola, Chaiane, pelo apoio e por todos os bons momentos compartilhados.

A minha mãe, Georgina Aparecida Santana, pelo exemplo de mulher humilde e caridosa, por toda oração, carinho e amor incondicional;

Aos meus irmãos, Clélia, Isaias, Cleber, Marcos, Marcelo e Renata pelo apoio e carinho durante essa caminhada.

A toda minha família, pelas orações e pensamentos positivos.

Ao meu esposo, Leandro de Paula Sarto, por suportar todos os dias difíceis, por todo apoio e amor dedicado.

Ao meu querido filho, Eduardo Taniguchi Corrêa, pelo seu amor, pela compreensão perante a minha ausência no seu dia a dia e por ser o meu maior motivo para levantar todas as manhãs e seguir em frente, sem ele nada teria sentido.

Por fim, mas não menos importante ao meu pai Tokushi Taniguchi, por me inspirar forças todos os dias, para lutar contra meus momentos de tristeza, sendo exemplo de que o dinheiro não traz a felicidade, mas a felicidade esta em nossos corações.

O MEU MUITO OBRIGADA!

BIOGRAFIA

Marisa Taniguchi Sarto, filha de Georgina Aparecida de Santana e Tokushi Taniguchi, nasceu em 23 de julho de 1984, em Lavras-MG. Coursou o ensino fundamental na escola municipal Paulo Menicucci e o ensino médio na escola estadual João Batista Hermeto, finalizando o ensino médio, em 2002. Em março de 2010, ingressou no curso de Ciências Biológicas-Licenciatura à distância, no Centro Universitário do Sul de Minas, concluindo o curso em fevereiro 2013. Entre julho de 2012 a janeiro de 2013 foi estagiaria na área de pesquisa e desenvolvimento com foco no rerrefino de óleo lubrificante usado, sendo contratada como analista de pesquisa e desenvolvimento em janeiro de 2013, até julho de 2013, pela empresa PROLUMINAS, Varginha - MG. Em agosto de 2013, ingressou no Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Lavras MG, onde realizou pesquisas na área de micropropagação e criopreservação de espécies ornamentais e nativas do Cerrado, sob a orientação da Prof^a. Dra Patrícia Duarte de Oliveira Paiva.

“Não há satisfação maior do que aquela que sentimos quando
proporcionamos alegria aos outros.”

Masaharu Taniguchi

RESUMO GERAL

O gênero *Alibertia* possui espécies frutíferas nativas do Cerrado que apresentam potencial econômico devido às propriedades medicinais, madeiras, ornamentais e alimentícias. Objetivou-se estabelecer o cultivo *in vitro* e conservação a longo prazo de *Alibertia sessilis* Schum, bem como também a conservação a longo prazo para *Alibertia edulis* Rich. Em sementes de *A. sessilis* foi realizada a caracterização da curva de embebição de água. Para as análises da composição química foram realizadas as determinações de extrato etéreo, proteína, fibra, cinza, grau de umidade, amido, açúcar redutor, açúcar não redutor e açúcar solúveis totais. Para o cultivo *in vitro* as sementes foram inoculadas em meio de cultivo MS. Na indução de brotações foram utilizados segmentos nodais inoculados com diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,62; 1,25; 2,5; 5,0 e 10 μ M). Para a indução de calos os explantes foliares foram excisados e inoculados com diferentes concentrações de 2,4-D ou Picloram (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 μ M). Com o intuito de induzir calos em explantes alternativos, ápices caulinares foram inoculados em diferentes concentrações de 2,4-D (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 μ M). Para a criopreservação das sementes foi determinado o teor de água e em seguida foi realizada a desidratação em sílica gel nos períodos de 0, 15, 30, 60 e 90 min. e posteriormente foi feita a imersão em nitrogênio líquido. Os embriões foram excisados e posteriormente, submetidos à técnica *droplet vitrification*, para a realização da criopreservação de embriões zigóticos. Já em sementes de *A. edulis* foi determinado o teor de água e em seguida foi realizada a desidratação em sílica gel nos períodos de 0, 10, 20, 40 e 60 min. e posteriormente as sementes foram imersas em nitrogênio líquido, após 60 dias da criopreservação as plântulas germinadas foram aclimatizadas. Sementes de *A. sessilis* apresentam umidade de 31,16% as quais são classificadas como amiláceas devido seu conteúdo de amido 16%. A germinação *in vitro* de sementes de *A. sessilis* foi de 93% aos 30 dias em meio de cultivo MS. A concentração ótima estimada para indução de brotos em segmentos nodais foi de 8,0 μ M de BAP. Para indução de calos em segmentos foliares a concentração ótima estimada é de 12,67 μ M de 2,4-D. Para indução de calos em ápices caulinares a concentração ótima estimada foi de 12,42 μ M de 2,4-D. As sementes e os embriões de *A. sessilis* não sobreviveram à criopreservação em nitrogênio líquido, porém, ambas apresentaram respostas positivas na questão de sobrevivência à desidratação. Para obtenção de máxima sobrevivência de sementes *A. edulis*, após a criopreservação recomenda-se a desidratação em sílica gel por 73 minutos.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*. Criopreservação. Sementes. Medicinal.

GENERAL ABSTRACT

The genus *Alibertia* has native fruit species of the Cerrado that have economic potential due to the medicinal properties, timber, ornamental and food. The objective was to establish *in vitro* culture and long-term conservation of *Alibertia sessilis* Schum, as well as long-term conservation also to *Alibertia edulis* Rich. In seeds of *A. sessilis* was performed the characterization of the water imbibing curve. For the analysis of the chemical composition were held the ether extract determinations, protein, fiber, ash, moisture content, starch, reducing sugar, non-reducing sugar and total soluble sugar. For cultivation *in vitro* seeds were inoculated in MS culture. In shoot induction were used nodal segments inoculated with different concentrations of BAP (0,0; 0,62; 1,25; 2,5; 5,0 and 10,0 mM). For induction of callus foliar explants were excised and inoculated with different concentrations of 2,4-D and Picloram (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 and 20,0 mM). In order to induce calluses on alternative explants, shoot tips were inoculated at different concentrations of 2,4-D (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 and 20,0 mM). For cryopreservation of seeds was determined water content, and then dehydration was carried out on silica gel to periods of 0, 15, 30, 60 and 90 minutes and it was later made immersion in liquid nitrogen. The embryos were, then, excised and subjected to droplet vitrification technique, to carry out the cryopreservation of zygotic embryos. Already in *A. edulis* seed was determined water content, and then dehydration was carried out on silica gel to periods of 0, 10, 20, 40 and 60 minutes and after that the seeds were immersed in liquid nitrogen, after 60 days of cryopreservation the germinated seedlings were acclimatized. *A. sessilis* seeds have a moisture 31,16% which are classified as starch because of its starch content 16%. The *in vitro* germination of *A. sessilis* seeds was 93% at 30 days in MS medium. The optimum concentration for induction estimated shoots in nodal segments was 8.0 mM of BAP. For induction of callus from leaf segments estimated optimal concentration is 12,67 mM of 2,4-D. For callus induction in shoot tip the optimum estimated concentration was 12,42 mM of 2,4-D. The seeds and embryos of *A. sessilis* did not survive the cryopreservation in liquid nitrogen, however, both showed positive responses in question survival to dehydration. To obtain maximal survival *A. edulis* seed after cryopreservation recommended dehydration silica gel for 73 minutes.

Keywords: *In vitro* culture. Cryopreservation. Seeds. Medicinal.

SUMÁRIO		Pág.
1	INTRODUÇÃO GERAL	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	<i>Alibertia sessilis</i> e <i>Alibertia edulis</i>	16
2.2	Caracterização de sementes de <i>Alibertia sessilis</i>	19
2.3	Cultura de tecidos	21
2.4	Criopreservação	22
	REFERÊNCIAS	24
	ARTIGO I- CARACTERIZAÇÃO DE SEMENTES E CULTIVO <i>in vitro</i> DE <i>Alibertia sessilis</i> Shum	29
	RESUMO	30
	ABSTRACT	32
1	INTRODUÇÃO	33
2	MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1	Curva de embebição de sementes	35
2.2	Composição química de sementes	36
2.3	Material vegetal e desinfestação	36
2.4	Germinação de sementes	37
2.5	Indução de brotações	37
2.6	Indução de calos em explantes foliares	37
2.7	Indução de calos em ápices caulinares	38
2.8	Análises estatísticas	38
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.1	Curva de embebição de sementes	40
3.2	Composição química de sementes	41
3.3	Germinação de sementes	44
3.4	Indução de brotações	45
3.5	Indução de calos em explantes foliares	49
3.6	Indução de calos em ápices caulinares	51
4	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55
	ARTIGO II - CRIOPRESERVAÇÃO <i>in vitro</i> DE <i>Alibertia sessilis</i> Shum	60
	RESUMO	61
	ABSTRACT	63
1	INTRODUÇÃO	64
2	MATERIAL E MÉTODOS	66
2.1	Teor de água de sementes	66
2.2	Criopreservação de sementes por desidratação em sílica gel	66

2.2.1	Material vegetal e desinfestação	66
2.2.2	Desidratação	67
2.2.3	Criopreservação	67
2.2.4	Condições de crescimento	67
2.3	Criopreservação de embriões zigóticos via Droplet Vitrification	68
2.3.1	Condições de crescimento	68
2.4	Análises estatísticas	69
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
3.1	Teor de água de sementes	70
3.2	Criopreservação de sementes por desidratação em sílica gel	71
3.3	Criopreservação de embriões zigóticos via Droplet Vitrification	74
4	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS	78
	ARTIGO III- CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Alibertia edulis</i> Rich POR DESIDRATAÇÃO EM SÍLICA GEL	81
	RESUMO	82
	ABSTRACT	83
1	INTRODUÇÃO	84
2	MATERIAL E MÉTODOS	85
2.1	Teor de água de sementes	85
2.2	Criopreservação de sementes por desidratação em sílica gel	85
2.2.1	Material vegetal e desinfestação	85
2.2.2	Desidratação	86
2.2.3	Criopreservação	86
2.2.4	Condições de crescimento	86
2.3	Aclimatização de plântulas	86
2.4	Análises estatísticas	87
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
3.1	Teor de água de sementes	88
3.2	Criopreservação de sementes por desidratação em sílica gel	89
3.3	Aclimatização de plântulas	91
4	CONCLUSÃO	92
	REFERÊNCIAS	94

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO GERAL

A inserção e disponibilização de plantas nativas para a comercialização representa um diferencial para o mercado, que esta sempre a procura de novidades e produtos considerados de impacto ambiental reduzido, garantindo maior competitividade. Diversos estudos tem reforçado a possibilidade do uso de espécies nativas do Cerrado com potencial ornamental, visando colaborar com a preservação da flora local e reforçar as identidades regionais. Além disso, as espécies nativas do Cerrado podem ser usadas na recuperação de áreas degradadas (HEIDEN; BARBIERI; STUMPF, 2006).

Dentre as espécies nativas do Cerrado com potencial ornamental a *Alibertia sessilis* Shum e *Alibertia edulis* Rich se destacam por apresetarem altura máxima de oito metros, copa densa sem necessidade de poda frequente, frutos pequenos, com folhagem bonita e flores brancas exuberantes. Além do potencial ornamental, são espécies de grande importância alimentícia para a fauna local e por fazerem parte de florestas ripárias e matas ciliares são indicadas para recuperação de áreas degradadas. Além disso, merecem atenção especial devido seu uso na medicina popular (ARAÚJO; PIRES, 2009; GUARIM NETO; MORAIS, 2003).

No entanto, um dos domínios fitogeográficos das espécies em questão é o Cerrado, e este por sua vez está sendo constantemente ameaçado, devido à exploração acelerada da agropecuária, queimadas, desmatamentos e remoção da mata nativa. Desta forma, a biodiversidade é prejudicada, ocorrendo desequilíbrios ecológicos e aumento do risco de extinção das espécies. O que torna necessário à busca por alternativas destinadas a manutenção e ou conservação (BERNACCI; IMIG; MEZZONATO, 2015; CENTRO NACIONAL RECURSOS GENÉTICOS - CENARGEN, 2015).

Uma das alternativas para manutenção de espécies nativas do Cerrado é a cultura de tecidos, por viabilizar a inclusão em bancos de germoplasma *in vitro* e a troca de materiais genéticos com maior facilidade, além, da obtenção de mudas em larga escala com menor espaço de tempo (KELLER et al., 2013; PINHAL et al., 2011). Outra importante ferramenta utilizada na preservação de espécies é a Criopreservação, que consiste na conservação em longo prazo, por meio do resfriamento em nitrogênio líquido em temperaturas ultra baixas (-196 °C). Nesta técnica muitos explantes podem ser utilizados, incluindo, sementes, tecidos e embriões (SALAJ, 2011).

Apesar do alto potencial de uso dessas espécies e a constante devastação do seu habitat natural, ainda são poucas as informações encontradas a respeito do cultivo *in-vitro* e conservação a longo prazo. Diante do exposto, objetivou-se estabelecer o cultivo *in vitro* de *A. sessilis* e conservação a longo prazo de *A. sessilis* e *A. edulis*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Alibertia sessilis* e *Alibertia edulis*

A. sessilis e a *A. edulis* são espécies nativas pertencentes à família Rubiaceae. Estão presentes no Norte (Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins), Nordeste (Bahia, Ceará, Maranhão, Piauí), Centro-oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso) e Sudeste (Minas Gerais, São Paulo), tendo como domínios fitogeográficos o Cerrado e a Amazônia (BARBOSA; ZAPPI, 2015).

Os frutos dessas espécies são fonte alimentar de aves e nativos da região, podendo ser consumidos frescos ou como geléias, doces e sorvetes, além disso, sua madeira pode ser empregada para lenha e carvão (LORENZI, 2002; SILVA et al., 2001). As suas sementes possuem variações no tamanho, forma e coloração, sendo estas variações de grande importância na sua identificação (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; GUERREIRO, 2006).

A *A. sessilis* é conhecida como marmelada de cachorro e é uma planta dotada de copa baixa, chegando a atingir de 3 a 4 metros de altura. Os frutos apresentam formato ovóide, globulosos, epicarpo de coloração atropurpúreo (negro-violáceo), mesocarpo carnoso, com polpa de coloração castanho-esverdeada escura (APPROBATO; GODOY, 2006; LORENZI, 2002; MATHEUS; BACELAR; OLIVEIRA, 2008).

A *A. edulis* é conhecida como marmelada bola, possui porte pequeno, de 3 a 8 metros de altura e copa de 2 a 3 metros de diâmetro, com frutos de formato globoso e coloração negra quando maduro. Sendo amplamente distribuída no Cerrado (LORENZI, 2002; MARGALHO; ROCHA; SECCO, 2009; TAYLOR; CAMPOS; ZAPPI, 2007).

Essas espécies possuem flores brancas, com folhagem bonita e a floração podendo variar entre agosto a fevereiro. Os frutos de *A. sessilis* amadurecem entre novembro e fevereiro. Enquanto os frutos de *A. edulis* de setembro a novembro (APPROBATO; GODOY, 2006; MARGALHO; ROCHA; SECCO, 2009; MATHEUS; BACELAR; OLIVEIRA, 2008).

Ambas as espécies apresentam potencial ornamental, sendo indicadas para arborização de praças públicas e ao entorno de estradas, ainda podendo ser utilizadas para reflorestamentos visando à recuperação de áreas degradadas (APPROBATO; GODOY, 2006; LORENZI, 2002; MATHEUS; BACELAR; OLIVEIRA, 2008). Na periferia de Goiânia-GO a *A. edulis* foi indicada como uma das espécies mais apropriadas para arborização urbana, por apresentar altura máxima de oito metros, copa densa sem necessidade de poda frequente, além de floração e frutificação restrita há poucos meses no ano (ARAÚJO; PIRES, 2009).

Tanto a *A. sessilis* quanto a *A. edulis* apresentam potencial medicinal. A *A. sessilis* possui folhas, ramos e brotos que podem ser utilizados no tratamento de lesões na pele, devido às suas propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes e antifúngicas dos ramos (BARREIRO; MACHADO, 2007; MACHADO et al., 2012; RODRIGUES; CARVALHO, 2001; SILVA et al., 2006). Enquanto em folhas de *A. edulis* encontra-se a presença de alcalóides, taninos e saponinas (SILVA; MIRANDA; CONCEIÇÃO, 2010).

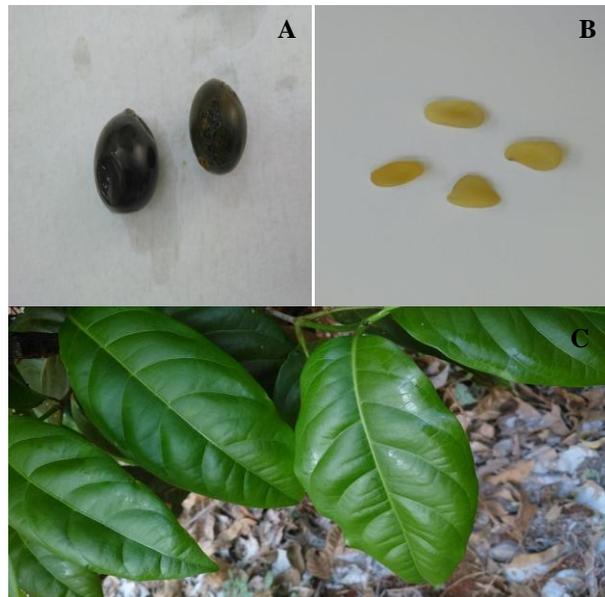


Figura 1A, 1B e 1C: *A. sessilis*- Fruto (A), sementes (B) e folhas (C).
Fonte: Arquivo pessoal

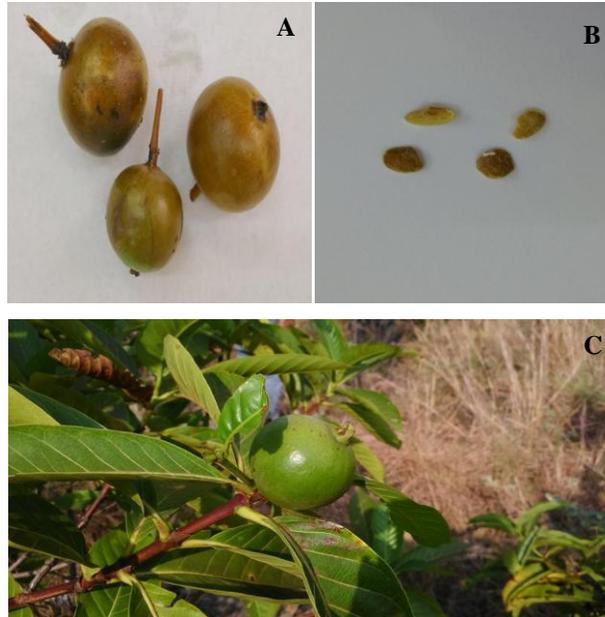


Figura 3A, 3B e 3C: *A. edulis*- Fruto (A), sementes (B) Folhas(C).
Fonte: Arquivo pessoal

2.2 Caracterização das sementes de *A. sessilis*

Apesar do potencial de uso das espécies nativas do Cerrado, existem muitos aspectos ainda desconhecidos. O fruto de *A. sessilis* contém 37 sementes (± 8), que levam de 4 a 6 semanas para germinar apresentando uma taxa superior a 50% de germinação (LORENZI, 2002; MATHEUS; BACELAR; OLIVEIRA, 2008). No entanto, até o momento não se sabe como as sementes de *A. sessilis* se classificam. Dessa maneira a caracterização e o conhecimento do comportamento fisiológico da espécie podem contribuir com as técnicas utilizadas para conservação da mesma.

A germinação das sementes inicia-se com a imbebição e constitui a fase do ciclo de vida que influencia diretamente a distribuição das plantas na natureza. A embebição por sua vez é considerada o mecanismo de absorção de água, um fenômeno biológico que pode ser definido como a retomada do crescimento do embrião, com subsequente rompimento do tegumento pela radícula e posterior desenvolvimento da raiz principal (ANDRADE; JESUS; MARTINS, 2006; MARCOS FILHO, 2005; SOUZA et al., 2007).

Durante o processo de germinação, a absorção de água pelas sementes, é crucial na retomada das atividades metabólicas e segue padrão trifásico na maioria das espécies. A primeira fase ocorre de forma rápida, devido à diferença de potencial de água, entre a semente e o substrato. A segunda fase da germinação é caracterizada por perda extrema na velocidade de absorção, marcada pela reativação do metabolismo. Enquanto a terceira fase inicia-se com a projeção da raiz primária. Essas três fases originam a curva de absorção de água pela semente (BEWLEY; BLACK, 1994; MARCOS FILHO, 2005).

A curva de absorção de água pelas sementes evidencia sua importância através das suas fases de entrada de água, essas estão ligadas tanto com o esclarecimento do processo germinativo, quanto com a definição da duração de

tratamentos com reguladores vegetais e pré-hidratação (ALBUQUERQUE; RODRIGUES; MENDONÇA, 2000; CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; FERREIRA et al., 2006). De modo que, o conhecimento do padrão de absorção de água em sementes é significativo na medida em que se permite avaliar as condições adequadas para a rápida emergência das plântulas (SMIDERLE; LIMA; PAULINO, 2013).

As análises de composição química das sementes tem grande valor, pois este conhecimento pode auxiliar, na obtenção de plantas de maior vigor, considerando que, quanto maior o teor de reservas das sementes, maior será o vigor das plântulas originadas (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; FERREIRA; BORGHETTI, 2004). Além disso, a germinação e o potencial de armazenamento das sementes podem ser influenciados pelo conteúdo dos compostos presentes nas mesmas (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

A compreensão prévia do comportamento fisiológico das sementes durante a secagem e o armazenamento, pode influenciar para a conservação eficiente das mesmas, sendo que nem todas as espécies são tolerantes a desidratação, requerindo condições especiais de armazenamento. Nesse sentido, as sementes são classificadas em três grupos quanto ao seu comportamento: sementes ortodoxas, sementes intermediárias e sementes recalcitrantes (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990; HONG; LININGTON; ELLIS, 1996; SACANDÉ et al., 2004).

Desse modo, os estudos da curva de absorção de água pelas sementes de *A. sessilis* e a composição química contribuirão para caracterizar o processo de germinação e agregar informações importantes sobre o comportamento desta espécie.

2.3 Cultura de Tecidos

A cultura de tecidos é uma alternativa para a propagação de espécies vegetais por meio de diferentes técnicas. Essa ferramenta permite a propagação de espécies que apresentam dificuldade de germinação, a produção de mudas em larga escala e a inclusão de espécies em bancos de germoplasma, além de aumentar a facilidade de trocas de materiais genéticos (KELLER et al., 2013; PINHAL et al., 2011).

Assim, a técnica de propagação *in vitro* tem contribuído para propagação de espécies nativas do Cerrado (PÊGO; PAIVA; PAIVA, 2013). As técnicas de propagação vegetativa apresentam a finalidade de obter a multiplicação de plantas, seja através de embriogênese somática, direta ou indireta, indução de calos e formação de novos brotos (AHMED et al., 2001). Ela facilita a produção uniforme e reduz o tempo de propagação, não dependendo das condições climáticas e sendo especialmente útil em espécies que apresentam sementes recalcitrantes, que rapidamente perdem sua viabilidade (SIDDIQUE, 2003).

Foram realizados estudos com *A. edulis* estabelecendo o protocolo de micropropagação para esta espécie (SILVA; PEREIRA; SILVEIRA, 2008). Mas para a *A. sessilis* não há estudos realizados para o cultivo *in vitro*, sendo encontrados apenas estudos para aplicabilidade tecnológica de *A. sessilis* (SILVA et al., 2013), para a descrição morfológica de fruto e sementes (MATHEUS; BACELAR; OLIVEIRA, 2008), além do uso medicinal e composição química dos seus ramos (OLIVEIRA, 2011).

2.4 Criopreservação

A criopreservação é uma técnica de conservação a longo prazo, capaz de reduzir todo o metabolismo celular. Tem sido considerada a maneira mais promissora de preservação a longo prazo para células, tecidos e órgãos vegetais, uma vez que, a partir desses explantes, poderão ser regeneradas plantas em qualquer época, sem risco de variações genéticas no material preservado (CARVALHO; VIDAL, 2003; CHEN et al., 2011). Ou seja, é uma técnica de armazenamento de material biológico vivo, em temperaturas ultra baixas, que pode ser considerada viável para uma série de espécies que apresentam dificuldades de armazenamento pelos métodos tradicionais (ENGELMANN, 2004, 2011).

A criopreservação apresenta algumas vantagens em relação a outras metodologias de conservação, entre elas a redução ou eliminação de danos causados no DNA, a possibilidade de controlar a variabilidade, avaliações periódicas diminuídas e ainda contorna problemas como doenças. Além disso, é o método que melhor garante o armazenamento em longo prazo de germoplasma em pequenos volumes e teoricamente por período ilimitado (ENGELMANN, 2011; KACZMARCZYK et al., 2011; PENCE, 2011).

Quando expostos a baixas temperaturas a maioria dos materiais utilizados na criopreservação (sementes, calos, embriões, entre outros) podem sofrer lesões de congelamento causadas pela formação de cristais de gelo, isso se deve as quantidades elevadas de água intracelular que os mesmos contêm, tornando-os extremamente sensíveis (REED, 2008). Assim, para que a criopreservação seja então alcançada com êxito é preciso que não haja a formação de gelo no interior dos tecidos (ENGELMANN, 2011; PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005).

Dessa forma, a desidratação artificial é necessária para que se evite a formação dos cristais de gelo intracelular, que pode ocorrer durante o resfriamento e reaquecimento, mas essa desidrataçãõ tem que ser a um teor de umidade baixo, porém que não cause à desidrataçãõ severa das células (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008; SANTOS, 2001).

Para criopreservação diferentes métodos podem ser empregados, sendo classificados de acordo com os mecanismos os quais se baseiam. Esses métodos são diferenciados como metodologia clássica na qual é realizado o resfriamento lento do material a uma temperatura pré-determinada, seguida de imersão rápida em nitrogênio líquido, onde a desidrataçãõ é induzida durante o resfriamento, e a metodologia contemporânea na qual é realizado o resfriamento rápido, onde a desidrataçãõ é baseada na vitrificação (ENGELMANN, 2011; REED, 2008).

Na vitrificação a maior parte da água intracelular é retirada antes do resfriamento da amostra. Visto que, ao se realizar a desidrataçãõ, o material é submetido ao resfriamento rápido pela imersão em nitrogênio líquido induzindo a vitrificação dos solutos internos. A solidificação dos líquidos ocorre sem passar pela fase de cristalização, pela utilização de crioprotetores em altas concentrações as quais as amostras são expostas (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008; REDD, 2008).

REFERÊNCIAS

- AHMED, Z. et al. Novel micropropagation system. **Journal of Biological Sciences**, Singapore, v. 1, n. 11, p. 1106-1111, 2001.
- ALBUQUERQUE, M. C. F.; RODRIGUES, T. de J. D.; MENDONÇA, E. A. F. Absorção de água por sementes de *Crotalaria spectabilis* Roth determinada em diferentes temperaturas e disponibilidade hídrica. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 206-215, 2000.
- ANDRADE, R. A.; JESUS, N.; MARTINS, A. B. G. Embebição e germinação de sementes de Camu-camu. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 4, p. 499-501, out./dez. 2006.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. A.; GUERREIRO, S. M. C. **Anatomia vegetal**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 424 p.
- APPROBATO, A. U.; GODOY, S. A. P. Levantamento de diásporos em áreas de cerrado no Município de Luiz Antônio. **Hoehnea**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 385-401, 2006.
- ARAÚJO, R. C. R.; PIRES, L. L. Opções de frutíferas do cerrado para paisagismo urbano em bairros da periferia de Goiânia-GO. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, out./dez. 2015. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oaid=237117843034>>. Acesso em: 10 nov. 2015.
- BARBOSA, M. R.; ZAPPI, D. **Alibertia in lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico, 2015. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB13822>>. Acesso em: 27 jul. 2015.
- BARREIRO, D. P.; MACHADO, S. R. Coléteres dendróides em *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum., uma espécie não-nodulada de Rubiaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 387-399, jul./set. 2007.
- BERNACCI, L. C.; IMIG, D. C.; MEZZONATO, A. C. **Passifloraceae in lista e espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico, 2015. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12506>>. Acesso em: 27 jul. 2015.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds**: physiology of development and germination. 2nd ed. New York: Plenum, 1994. 445 p.

CARVALHO, J. M. F.; VIDAL, M. S. **Crioconservação no melhoramento vegetal**. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2003. 22 p. (EMBRAPA Algodão. Documentos, 115).

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

CENTRO NACIONAL RECURSOS GENÉTICOS. **Embrapa Brasil**. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br>>. Acesso em: 9 jul. 2015.

CHEN, X. L. et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. **South African Journal of Botany**, Brisbane, v. 77, n. 2, p. 397-403, 2011.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, H. An intermediate category of seed storage behaviour?: I, coffee. **Journal of Experimental of Botany**, London, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, 1990.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Wallingford, v. 40, n. 5, p. 427-433, 2004.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Wallingford, v. 47, n. 1, p. 5-16, Feb. 2011.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323 p.

FERREIRA, G. et al. Curva de absorção de água em sementes de atemoia (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.) cv. gefner. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 121-124, 2006.

GONZALEZ-ARNAO, M. T. et al. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 1-13, Jan. 2008.

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 561-584, 2003.

HEIDEN, G.; ROSA LÍA BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. Considerações sobre o uso de plantas ornamentais nativas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 12, n. 1, p. 2-7, 2006.

HONG, T. D.; LININGTON, S.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behaviour**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 55 p. (IPGRI Handbooks for Genebanks, 4).

KACZMARCZYK, A. et al. Cryopreservation of threatened native Australian species: what have we learned and where to from here? **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Wallingford, v. 47, n. 1, p. 17-25, Feb. 2011.

KELLER, E. R. J. et al. Comparing costs for different conservation strategies of garlic (*Allium sativum* L.) germoplasm in genebanks. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 60, n. 3, p. 913-926, 2013.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002. v. 2, 384 p.

MACHADO, S. R. et al. Dendroid colleters on vegetative and reproductive apices in *Alibertia sessilis* (Rubiaceae) differ in ultrastructure and secretion. **Flora**, London, v. 207, n. 12, p. 868-877, Dec. 2012.

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

MARGALHO, L. F.; ROCHA, A. E. S.; SECCO, R. S. Rubiaceae Juss. da restinga da APA de Algodual/Maiandeuá, Maracanã, Pará, Brasil. Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. **Ciência Natura**, Belém, v. 4, n. 3, p. 303-339, set./dez. 2009.

MATHEUS, M. T.; BACELAR, M.; OLIVEIRA, S. A. S. Descrição morfológica de frutos e sementes de Marmelinho-do-campo - *alibertia sessilis* schum. - (rubiaceae). **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 21, n. 3, p. 60-61, dez. 2008.

OLIVEIRA, D. L. Economic viability of some medicinal plants native cerrado. **Estudos**, Goiânia, v. 38, n. 2, p. 301-332, abr./jun. 2011.

PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant Science**, Shannon, v. 168, n. 1, p. 45-55, 2005.

PÊGO, R. G.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R. Micropropagation of *Syngonanthus elegantulus*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 37, n. 1, p. 32-39, jan./fev. 2013.

PENCE, V. C. Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Wallingford, v. 47, n. 1, p. 176-187, Feb. 2011.

PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos de tecidos em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, jul. 2011.

REED, B. M. **Plant cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, 2008. 515 p.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domíniodo cerrado na região do Alto Rio Grande, Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 102-123, jan./fev. 2001.

SACANDÉ, M. et al. **Comparative storage biology of tropical tree seeds**. Rome: IPGRI, 2004. 363 p.

SALAJ, T. et al. Regrowth of embryogenic tissues of *Pinus nigra* following cryopreservation. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 106, n. 1, p. 55-61, 2011.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal: alternativa para conservação a longo prazo. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 20, p. 60-65, maio/jun. 2001.

SIDDIQUE, N. A. Plant regeneration from nodal segments derived callus in *Hemidesmus indicus* (L.) R. Br (Anantamul) an endangered medicinal plant. **Journal of Biological Sciences**, Singapore, v. 3, n. 12, p. 1158-1163, 2003.

SILVA, D. B. et al. **Frutas do Cerrado**. Brasília: EMBRAPA, 2001. 178 p.

SILVA, V. C. et al. Isolation of lignans glycosides from *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. (Rubiaceae) by preparative high-performance liquid chromatography. **Eclética Química**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 55-58, 2006.

SILVA, F. A. B.; PEREIRA, L. A. R.; SILVEIRA, C. E. S. Micropropagation of *Alibertia edulis* Rich. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 51, n. 6, p. 1103-1114, Nov./Dec. 2008.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem fitoquímica de plantas de cerrado, da área de proteção ambiental municipal do Inhamum, Caxias. **Scientia Plena**, Aracajú, v. 6, n. 2, p. 1-17, 2010.

SILVA et al. Aplicabilidade tecnológica da marmelada-de-cachorro (*Alibertia sessilis* Schum.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 15, n. 3, p. 263-271, 2013.

SMIDERLE, O. J.; LIMA, J. M. E.; PAULINO, P. P. S. Curva de absorção de água em sementes de *Jatropha curcas* L. com dois tamanhos. **Revista AgroAmbiente On-line**, Boa Vista, v. 7, n. 2, p. 203-208, maio/ago. 2013.

SOUZA, E. B. et al. Germinação de sementes de *adenanthera pavonina* L. em função de diferentes temperaturas e substratos. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, n. 3, p. 437-443, maio/jun. 2007.

TAYLOR, C. M.; CAMPOS, M. T. V. A.; ZAPPI, D. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rubiaceae. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 58, n. 3, p. 549-616, 2007.

ARTIGO I

CARACTERIZAÇÃO DE SEMENTES E CULTIVO *in vitro* DE
Alibertia sessilis **Schum.**

CARACTERIZAÇÃO DE SEMENTES E CULTIVO *in vitro* DE *Alibertia sessilis* Schum.

MARISA TANIGUCHI SARTO^{1*}, PATRÍCIA DUARTE DE OLIVEIRA PAIVA², FERNANDA CARLOTA NERY³, RAFAELA RIBEIRO SOUZA⁴, RENATO PAIVA⁵, JOELMA PEREIRA⁶.

1 Mestranda em Agronomia/Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras/UFLA.

2 Dra., Professora Titular, Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras/ UFLA

3 Dra., Professora Adjunto, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras/ UFLA.

4 Doutoranda em Agronomia/ Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras/UFLA.

5 PhD, Professor Titular, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras/UFLA.

6 Dra., Professora Associada, Departamento de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras/ UFLA

*Correspondência: Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras/UFLA Caixa Postal 3037 Campus Universitário 37.200-000 Lavras - MG. Email para correspondência: marisatst@hotmail.com

RESUMO

A *Alibertia sessilis* é uma espécie nativa do Cerrado, pertencente à família Rubiaceae, de importância medicinal e alimentícia, com potencial ornamental. Objetivou-se caracterizar as sementes e estabelecer o cultivo *in vitro* de *A. sessilis*. Para a caracterização das sementes estudou-se a curva de embebição, sendo utilizadas quatro repetições constituídas de 10 sementes cada e para as análises da composição química das sementes determinou-se: extrato etéreo, proteína, fibra, cinza, grau de umidade, amido, açúcar redutor, açúcar não redutor e açúcares solúveis totais. No o cultivo *in vitro* as sementes foram inoculadas em meio de cultivo MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, gelificado com 2,5 g L⁻¹ de phytigel. Na indução de brotações foram usados segmentos nodais (2,0 cm) inoculados em meio de cultivo MS, com diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,62; 1,25; 2,5; 5,0 e 10 µM). Para a indução de calos explantes foliares foram excisados com aproximadamente 1,0 cm² e inoculados em meio de cultivo MS, suplementado com diferentes concentrações 2,4-D (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 µM) ou Picloram (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 µM). Com o intuito de induzir calos em explantes alternativos, ápices caulinares foram inoculados em meio de cultivo MS, foi suplementado com diferentes concentrações 2,4-D (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 µM). A curva de embebição apresenta o padrão trifásico. Sementes de *A. sessilis* apresentam umidade de 31,16% e são classificadas como amiláceas devido seu conteúdo de amido 16%.

A germinação *in vitro* de sementes de *A. sessilis* é de 93% aos 30 dias em meio de cultivo MS. A concentração ótima estimada para indução de brotos em segmentos nodais é de 8,0 μM de BAP. A concentração ótima estimada para indução de calos em segmentos foliares é de 12,67 μM de 2,4-D. A concentração ótima estimada para indução de calos em ápices caulinares é de 12,42 μM de 2,4-D.

Palavras-Chave: Cultivo *in vitro*. Cerrado. Medicinal. Ornamental.

ABSTRACT

The *Alibertia sessilis* is a native species from Cerrado, belonging to the Rubiaceae family, with medical and food significance, with ornamental potential. This study aimed to characterize the seeds and establish *in vitro* cultivation of *A. sessilis*. For the characterization of the seeds was studied imbibition curve, with four replicates consisting of 10 seeds each and the analysis of the chemical composition of the seeds was determined: ether extract, protein, fiber, ash, moisture content, starch, reducing sugar, non-reducing sugar and total soluble sugars. In *in vitro* culture, the seeds were inoculated in MS medium supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose, gelled with 2.5 g L⁻¹ Phytigel. In the shoot induction were used nodal segments (2.0 cm) inoculated in MS medium with different concentrations of BAP (0,0; 0,62; 1,25; 2,5; 5,0 and 10,0 mM). For induction of explants leaf calli excised with approximately 1.0 cm² and cultured on MS medium supplemented with different 2,4-D concentrations (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 and 20,0 mM) or Picloram (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 and 20,0 mM). In order to induce calluses on alternative explants, shoot tips were inoculated in MS medium was supplemented with different concentrations of 2,4-D (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 and 20,0 mM). The soaking curve shows the triphase pattern. *A. sessilis* seeds have a moisture 31.16% and are classified as starch because its starch content 16%. The *in vitro* germination of *A. sessilis* seeds is 93% at 30 days in MS medium. The optimum concentration for induction estimated shoots in nodal segments is 8.0 mM of BAP. The estimated optimal concentration for inducing callus from leaf segments is 12.67 mM of 2,4-D. The optimum estimated concentration for callus induction in shoot tips is 12.42 mM of 2,4-D.

Keywords: *In vitro* cultivation. Cerrado. Medicinal. Ornamental.

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado é um bioma brasileiro que representa 206 milhões de hectares, aproximadamente, 25% do território nacional. Sua flora é rica em espécies frutíferas nativas que produzem frutos saborosos, com elevado teor de vitaminas, proteínas e açúcares, entre outros (AGUIAR; CAMARGO, 2004; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2014; SILVA et al., 2001). Dentre as espécies nativas do cerrado destaca-se a *Alibertia sessilis* conhecida como marmelada de cachorro.

É uma espécie frutífera, extensamente utilizada pela medicina tradicional devido às suas propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes e antifúngicas dos ramos, além disso, apresenta potencial alimentício, ornamental e madeireiro (BARREIRO; MACHADO, 2007; GUARIM NETO; MORAIS, 2003; LORENZI, 2002; RODRIGUES; CARVALHO, 2001). A *A. sessilis* é subarbustiva com porte pequeno, é indicada para arborização de praças públicas, plantio sob rede elétrica e ao redor de estradas, podendo ser aproveitada para reflorestamentos visando à recuperação de áreas degradadas (APPROBATO; GODOY, 2006; MATHEUS; BACELAR; OLIVEIRA, 2008).

No entanto, o Cerrado tornou-se um dos biomas mais ameaçados e vem sendo destruído por diversos fatores entre eles incêndios, represamentos e derrubadas (OLIVEIRA; MARQUIS, 2002). Esse fato ajuda a despertar o interesse na preservação de espécies nativas de acordo com o aumento da sua visibilidade e importância econômica. Assim com o atual estado de devastação da natureza, é importante resgatar espécies com possibilidade de aplicação e divulgá-las, a fim de ampliar a oferta (CHAMAS; MATTHES, 2000; HEIDEN; BARBIERI; STUMPF, 2006).

Apesar do potencial de uso das espécies nativas do cerrado, existem muitos aspectos ainda desconhecidos, e a caracterização das sementes é de

grande importância. Uma vez que, se faz necessário o conhecimento do perfil da curva de absorção de água, por essa estar relacionada às pesquisas de impermeabilidade de tegumento e pré-hidratação, como na determinação da duração de tratamentos com reguladores vegetais e condicionamento osmótico (ALBUQUERQUE; RODRIGUES; MENDONÇA, 2000; ANASTÁCIO; SANTANA, 2010; BEWLEY; BLACK, 1994; CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Os estudos sobre a composição química das sementes contribuem na obtenção de plantas de maior vigor. Além disso, o conteúdo dos compostos presentes, podem influenciar a germinação e o potencial de armazenamento das mesmas (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; FERREIRA; BORGHETTI, 2004). Dessa forma, o estudo da curva de absorção de água e a composição química de sementes de *A. sessilis* contribuirão para caracterizar o processo de germinação e auxiliar em futuros estudos para padronização de testes para avaliação da qualidade fisiológica das sementes.

Atualmente, uma das ferramentas que tem sido utilizada com sucesso em várias espécies do Cerrado visando à produção em larga escala é a Cultura de tecidos. Essa ferramenta assegura formas alternativas para a exploração sustentável de algumas espécies, principalmente em ecossistemas ameaçados, uma vez, que dispõe de meios para maior produção de biomassa garantindo a conservação de espécies de interesse econômico (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; MORAES et al., 2012; PINHAL et al., 2011).

Mas a utilização dessa técnica em espécies nativas ainda é incipiente, já que, muitas plantas se encontram em estado selvagem, apresentando grande variabilidade genética (PINHAL et al., 2011). Diante do exposto, objetivou-se com a realização da pesquisa, caracterizar as sementes de *A. sessilis* e estabelecer o seu cultivo *in vitro*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados frutos maduros de *A. sessilis*, provenientes da cidade de Sacramento, Minas Gerais. O local da coleta localiza-se a uma latitude 19° 51'55'' sul e a uma longitude 47° 26'24'' oeste, estando a uma altitude de 832 metros, o bioma característico é Cerrado sensu stricto e o solo apresenta uma terra clara arenosa.

2.1 Curva de embebição de sementes

A curva de embebição das sementes foi realizada com sementes despulpadas e secas por 24 horas, em temperatura ambiente. As sementes foram divididas em quatro repetições de 10 sementes cada e colocadas em rolo de papel Germtest umedecido com água destilada (equivalente a 2,5 vezes o peso do papel) e, em seguida, transferidas para incubadora refrigerada tipo BODs com temperatura de 25°C, na presença de luz (fotoperíodo de 16h). A primeira pesagem foi realizada com as sementes secas e, posteriormente, a cada 30 minutos, durante as 12 primeiras horas, posteriormente as pesagens foram realizadas em intervalos crescentes de 1h, 3h, 4h, 6 h e, por último, de 12 em 12 horas até o término das avaliações.

O teste de germinação considerou a protrusão radicular a $\pm 2,0$ mm como critério para a avaliação da germinação. Ao final de 408 horas (17 dias), as sementes foram retiradas dos rolos de papel Germitest® pesadas (massa final), em seguida colocadas em estufa a 105 °C ± 2 °C, por 24 horas, para determinação do grau de umidade. Para ajuste da curva aos dados de embebição, foi utilizado o modelo não linear com maior coeficiente de determinação (BRASIL, 2009; RODRIGUES et al., 2008).

2.2 Composição química de sementes

Nas análises químicas as sementes foram secas em estufa de circulação de ar forçada a 70 °C até atingir peso constante. Após este procedimento as sementes foram trituradas e passaram pelo processo de extração. O grau de umidade foi determinado em estufa a 105 °C segundo a metodologia da Association of Official Analytical Chemists - AOAC (2000). O extrato etéreo das sementes foi determinado segundo o método da AOAC (2000). A fração proteica foi obtida pela determinação da porcentagem de nitrogênio total da amostra segundo o método de Kjeldahl (AOAC, 2000) e multiplicação pelo fator 6,25. A fibra bruta foi determinada pelo método gravimétrico de Kemer e Ginkel (1952). O resíduo mineral fixo (cinzas) foi determinado por incineração do material em mufla regulada a 550°C, segundo método da AOAC (2000). O teor de amido, açúcares solúveis totais, açúcares redutores e não redutores foram obtidos segundo método de Somogy adaptado de Nelson (1944).

2.3 Material vegetal e desinfestação

As sementes foram retiradas manualmente de frutos maduros de *A.sessilis*, lavadas para retirada da polpa e colocadas por 24 horas sobre papel Germitest em temperatura ambiente. A assepsia das sementes foi realizada em câmara de fluxo laminar, por imersão em álcool etílico a 70% durante um minuto e, posteriormente, em solução de hipoclorito de sódio comercial (2,5% de cloro ativo) acrescidos de duas gotas de Tween 20, durante 15 minutos. Em seguida foram lavadas três vezes em água destilada estéril.

2.4 Germinação de sementes

Após assepsia as sementes foram inoculadas em meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, gelificado com 2,5 g L⁻¹ de phytigel. Após, inoculadas as sementes foram transferidas para sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, 80% de umidade relativa, fotoperíodo de 16 horas com irradiância de 36 μmol. m⁻² s⁻¹. Aos 30 dias avaliou-se a porcentagem de germinação de acordo com a protusão da radícula.

2.5 Indução de brotações

Os explantes utilizados foram originados de plântulas germinadas *in vitro*. Segmentos nodais com aproximadamente 2,0 cm de comprimento e contendo duas gemas laterais foram inoculados na posição vertical em meio de cultivo MS, acrescido com 30 g L⁻¹ sacarose e gelificado com 2,5 g L⁻¹ de phytigel. Diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) (0,0; 0,62; 1,25; 2,5; 5,0 e 10 μM) foram suplementadas ao meio. Depois de inoculado o material foi transferido para sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2° C, 80% de umidade relativa, fotoperíodo de 16 horas com irradiância de fótons de 36 μmol m⁻²s⁻¹. Aos 30 dias foi avaliado comprimento da raiz e da parte aérea, o número de brotos e o número de folhas. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento, cada repetição constituída por 6 tubos contendo um explante cada.

2.6 Indução de calos em explantes foliares

Explantes foliares obtidos de folhas dicotiledonares derivadas de plântulas de *A. sessilis* germinadas *in vitro* (com 30 dias de inoculação) foram

excisados com aproximadamente $1,0 \text{ cm}^2$. Posteriormente foram inoculados em meio de cultivo MS, acrescido com 30 g L^{-1} de sacarose e gelificado com $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de phytigel, suplementado com 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 e $20,0 \text{ }\mu\text{M}$) ou Picloram (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 e $20,0 \text{ }\mu\text{M}$). O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, a 121°C . Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento no escuro sobre temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Após 30 dias de cultivo *in vitro*, avaliou-se a porcentagem de formação de calos. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento, cada repetição constituída por seis tubos e com um explante foliar disposto com a face adaxial em contato com o meio de cultura.

2.7 Indução de calos em ápices culinares

Ápices caulinares obtidos de plântulas de *A. sessilis* germinadas *in vitro* (com 30 dias de inoculação) foram excisados com aproximadamente $1,5 \text{ cm}^2$. Posteriormente foram inoculados em meio de cultivo MS, acrescido com 30 g L^{-1} de sacarose e gelificado com $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de phytigel, suplementado com 2,4-D) (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 e $20,0 \text{ }\mu\text{M}$). O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, a 121°C . Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento no escuro sobre temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Após 30 dias de cultivo *in vitro*, avaliou-se a porcentagem de formação de calos. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento, cada repetição constituída por seis tubos e com um ápice cada.

2.8 Análises Estatísticas

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado sendo utilizadas 30 repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de

variância, as médias quantitativas foram analisadas por regressão e as qualitativas pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro no programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Curva de embebição de sementes

As sementes de *A. sessilis* apresentaram absorção progressiva e de forma gradual entre 30 min e 40 horas, estabilizando-se a partir deste período. Observou-se que o início da mudança da fase I para a fase II ocorreu no período de 50 a 60 horas. A mudança da fase II para a fase III ocorreu aproximadamente nas 230 horas de embebição (Figura 1).

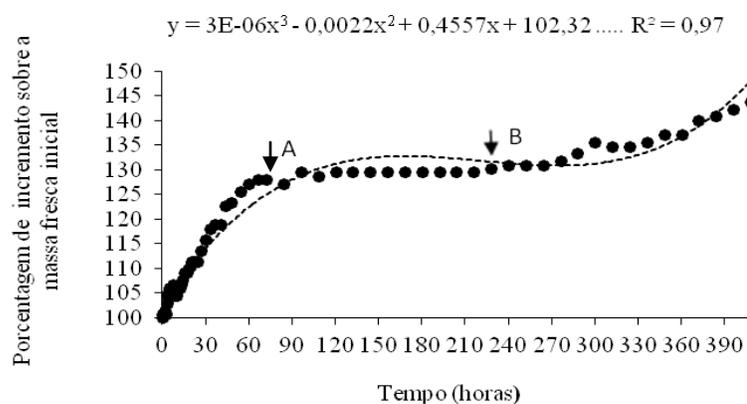


Figura 1: Incremento em relação à massa fresca inicial (% h⁻¹) de sementes de *A. sessilis*, ao longo do período de embebição. Setas: (A) indica o início da fase II; (B) o início da fase III.

No período de 408 horas, realizaram-se as pesagens e observou-se as mudanças das três fases fisiológicas, caracterizando o padrão trifásico de absorção de água pelas sementes com 90% de germinação. A embebição é um processo nitidamente físico e depende da ligação da água à matriz da semente. Considera-se que a absorção de água pelas sementes promove a reidratação dos

tecidos, intensificando a respiração e demais atividades metabólicas, que fornecem energia e nutrientes para a retomada do crescimento do eixo embrionário. Provocando o rompimento do tegumento, facilitando a emergência do eixo hipocótilo radicular e demais estruturas internas da semente (BORGES et al., 2009; CARDOSO, 2004; CASTRO; BRADFORD; HILHORST, 2004).

Na fase I, observou-se que à entrada de água ocorre de forma rápida, o que segundo Bewley e Black (1994) e Marcos Filho (2005), se deve à diferença de potencial de água, sendo este o processo físico, que ocorre independentemente da viabilidade ou dormência das sementes, desde que não relacionada a impedimentos físicos. Durante a fase II, verificou-se que a semente absorveu água lentamente e o eixo embrionário ainda não conseguiu crescer. Essa fase é indicada pela reativação do metabolismo (BEWLEY; BLACK, 1994; MARCOS FILHO, 2005). Já na fase III, verificou-se o início da projeção da raiz primária, posto que, ocorreu novo aumento no grau de umidade das sementes (MARCOS FILHO, 2005).

Portanto, como descrito por Andrade, Jesus e Martins (2006) e Marcos Filho (2005) o início do processo de embebição resultará na germinação das sementes. Dessa forma a curva de embebição descreveu o padrão trifásico completo, possibilitando a observação do processo de germinação de sementes de *A. sessilis*.

3.2 Composição química de sementes

As sementes de *A. sessilis* apresentaram 16% de amido, 13,32% de proteínas, seguido do açúcar solúvel total 6,51%, açúcar não redutor 1,90%, extrato etéreo 0,61% e açúcar redutor 0,12%. O conteúdo de fibra é de 16,27%, e o de cinzas de 2,76%, sendo a umidade de 31,16% (Tabela 1).

Tabela 1: Valores médios da composição química (%) das sementes de *A. sessilis*.

COMPONENTES	MÉDIA +-
Extrato Etéreo (%)	0,61
Proteínas (%)	13,32
Açúcar redutor g/100g	0,12
Açúcar não redutor g/100g	1,90
Açucars solúveis totais g/100g	6,51
Amido g/100g	15,76
Fibras (%)	16,27
Cinzas(%)	2,76
Umidade (%)	31,16

As sementes de *A. sessilis* podem ser classificadas como amiláceas devido seu conteúdo de amido 15,76%, sendo este sua principal fonte de reserva. O amido desempenha a função exclusiva de reserva, sendo também o carboidrato mais comumente encontrado nas sementes (AMARAL; PEREIRA; CORTELAZZO, 2001). As sementes amiláceas possuem um maior potencial de armazenamento que as oleaginosas, devido a maior estabilidade química do amido em relação aos lipídios (MARCOS FILHO, 2005).

As proteínas foram à fonte secundária de reservas encontrada em sementes de *A. sessilis* com 13,32%, o teor ressaltado de proteínas também pode contribuir para a redução do potencial de armazenamento, devido à elevada relação dessa substância com a água (MARCOS FILHO, 2005). O teor de cinzas encontrado nas sementes foi de 2,76%, esse conteúdo representa os elementos minerais presentes na amostra. Esses elementos mineirais podem se apresentar na cinza em forma de óxidos, sulfatos, fosfatos, silicatos e cloretos (CECCHI, 2003; SILVA, 2002).

Apesar do teor elevado de amido e proteínas, as sementes de *A. sessilis* apresentaram baixo teor de extrato etéreo 0,61%, este deve estar ligado com a

ausência de resina e lipídeos. Estes resultados foram seguidos também por um baixo conteúdo de açúcares redutores 0,12% e açúcar não redutor 1,90%, enquanto para açúcares solúveis totais a porcentagem encontrada foi de 6,51%, os açúcares solúveis totais além do seu papel central no metabolismo também regulam muitos outros processos fisiológicos, pois atuam sobre um número significativo de genes (GIBSON, 2004; MARCOS FILHO, 2005).

O grau de umidade de 31% das sementes se aproxima dos resultados obtidos com sementes de *C. brasiliense* Camb. que apresenta aproximadamente 45,6% de umidade (NERY et al., 2007). Para as espécies nativas como *A. sessilis* é importante o conhecimento do menor teor de água que as sementes suportam depois da coleta, sem causar comprometimento na qualidade fisiológica (NASCIMENTO; NOVEMBRE; CICERO, 2007).

Além disso, no que diz respeito à conservação de sementes o teor de umidade é considerado fator importante, pois a qualidade das sementes é influenciada, entre outros fatores, pelo teor de água, umidade relativa e temperatura do ar (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; CARVALHO; SILVA; DAVIDE, 2006; MARCOS FILHO, 2005; NASCIMENTO; NOVEMBRE; CICERO, 2007). Dessa forma são necessários estudos a fim de verificar o potencial de armazenamento para as sementes de *A. sessilis* e a possibilidade de uso como alimentos protéicos de origem vegetal, como alternativa de fonte alimentar (NUNES et al., 2003).

As sementes de *A. sessilis* também destacam-se pelo conteúdo de fibras encontrado, 16,27%. A fibra alimentar é uma fração complexa, composta por um conjunto de componentes, presentes nos alimentos vegetais, representados pela soma de lignina e polissacarídeos. As propriedades físico-químicas das fibras alimentares provêm diferentes resultados fisiológicos no organismo (LOBO; SILVA, 2001; MATTOS; MARTINS, 2000).

As fibras são classificadas, segundo sua solubilidade em água, como solúveis e insolúveis. Entre outros diversos fatores benéficos a saúde, podemos citar alguns de acordo com essa classificação. As fibras solúveis diminuem o esvaziamento gástrico, a absorção de glicose e reduzem o colesterol sanguíneo e as fibras insolúveis, elevam o peso das fezes, influenciam trânsito intestinal, facilitam a eliminação fecal, contribuindo assim para a diminuição do risco de doenças do trato gastrointestinal (GUTKOSKI; TROMBETTA, 1999; MATTOS; MARTINS, 2000).

Portanto, este trabalho traz subsídios para futuros estudos que foquem o potencial que as sementes de *A. sessilis* apresetam para a suplementação de dietas, principalmente em termos de fibra alimentar. Uma vez que, a recomendação de ingestão de fibra alimentar, em várias dietas alimentares gera efeitos benéficos à saúde (GREGORIO; AREAS; REYES, 2001). Além disso, os resultados encontrados nesse estudo poderão contribuir na classificação dessa espécie. Tendo em vista, um possível comportamento recalcitrante das sementes de *A. sessilis*.

3.3 Germinação de sementes

As sementes de *A. sessilis* iniciaram a germinação entre 5 a 30 dias de cultivo, apresentando germinação não homogenia, do tipo epígea com emergência vertical e ereta ao germinar *in vitro*. Após a germinação a raiz primária apresentou-se reta, de cor clara, branco-amarelada, seu sistema radicular com características pivotantes, com raiz primária axial (Figura 2).



Figura 2: Aspecto visual de sementes de *A. sessilis* germinadas após 15 dias de cultivo em meio MS.

A porcentagem de germinação (93%) de sementes foi obtida aos 30 dias de cultivo. Resultados semelhantes foram encontrados em sementes de *A. edulis*, a germinação *in vitro* apresentou porcentagem acima de 85% sem a necessidade de utilizar antioxidantes ou outros complementos em meio de cultivo. Em todos os tratamentos, a germinação das sementes de *A. edulis* se iniciou a cerca de 12 a 13 dias de cultivo e a maioria das sementes já haviam germinado aos 30 dias de cultivo (SILVA; PEREIRA; SILVEIRA, 2008). Dessa forma, a germinação *in vitro* de sementes de *A. sessilis* é viável, uma vez que, o período de germinação *in vitro* foi menor se comparada com a germinação em campo que pode levar até 6 semanas, além da porcentagem de germinação que atingiu 93% *in vitro* enquanto em campo pode ser superior a 50% (LORENZI, 2002).

3.4 Indução de brotações

As concentrações de BAP utilizadas, não foram suficientes para promover uma diferença significativa nas respostas entre os tratamentos acima de 2,5 μ M para a indução de novas brotações, sendo que o maior número de

brotos, 2,28, foi obtido na concentração de 10,0 μM , e não diferiu estatisticamente das concentrações 2,5 μM com a média de 1,88 brotos e 1,96 brotos para a concentração de 5,0 μM (Figura 3, 4 e 5).

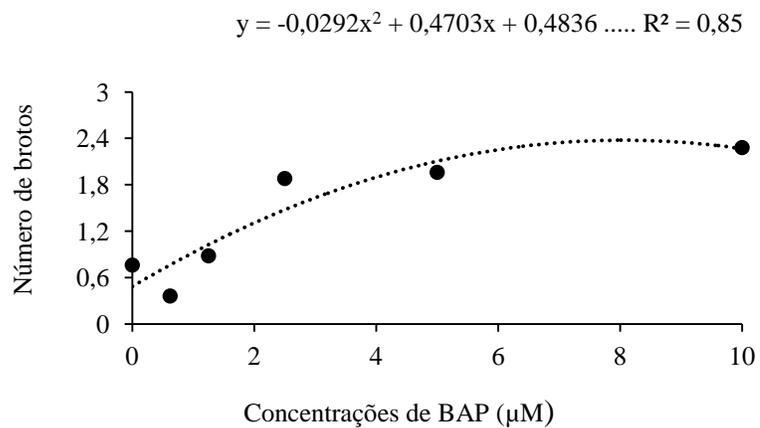


Figura 3: Número de brotações em segmentos nodais de *A. sessilis* em meio de cultivo MS suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,62; 1,25; 2,5; 5,0 e 10 μM).

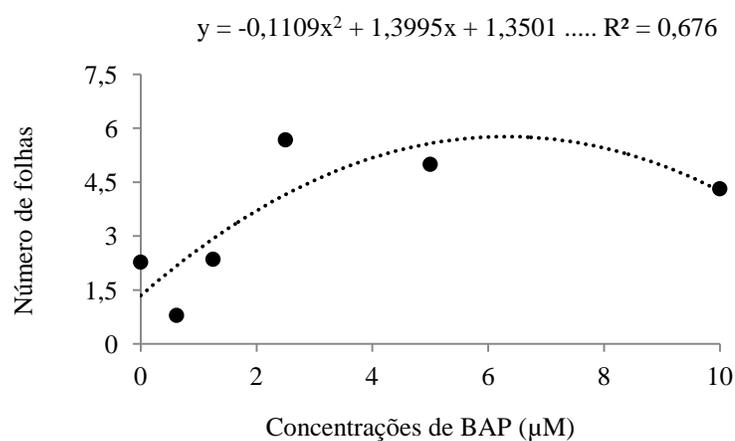


Figura 4: Número de folhas em segmentos nodais de *A. sessilis* em meio de cultivo MS suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,62; 1,25; 2,5; 5,0 e 10 µM).

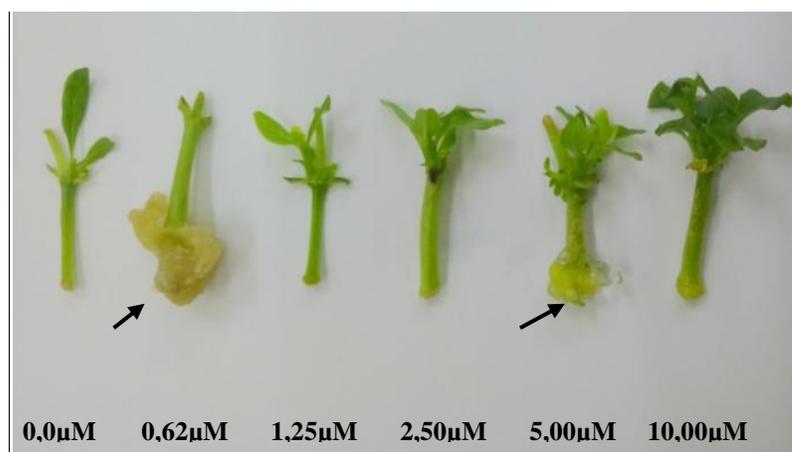


Figura 5: Aspecto visual de brotações em segmentos nodais de *A. sessilis*, após 30 dias de cultivo *in vitro*. Setas indicam formação de calo na base dos explantes.

A concentração de 8,0 µM de BAP foi considerada a concentração ótima para a indução de brotos. Resultados semelhantes foram encontrados em segmentos nodais de *A. edulis*, onde foi observado em torno de 1,8 brotos por explante ao acrescentar concentrações variadas de citocinina no meio de cultivo (SILVA; PEREIRA; SILVEIRA, 2008). Para o número de folhas os tratamentos

acima de 2,5 μM , também não diferem estatisticamente entre si, sendo formadas em média 5,0 folhas por explante nos segmentos nodais de *A. sessilis* nas concentrações de 2,5, 5,0 e 10 μM de BAP.

Também foi observada a formação de calos compactos na base dos segmentos nodais de *A. sessilis* submetidos ao tratamento com 0,62 e 5,0 μM de BAP. A formação de calos na base dos explantes possivelmente ocorreu devido ao equilíbrio no balanço de auxinas endógenas com a concentração de citocinina (BAP) aplicada do meio de cultivo. Porque para ocorrer a calogênese, deve haver um equilíbrio no balanço hormonal, sendo que no cultivo *in vitro* um fator que pode influenciar os eventos morfogênicos é uma possível interação entre as concentrações endógenas de reguladores de crescimento de plantas e os presentes no meio de cultura (GUERRA; NODARI, 2006; MERCIER; NIEVOLA, 2003).

Para que ocorra a formação de brotos é necessário que, no balanço auxinas e citocininas, as concentrações de citocininas se sobressaiam. Já que, a citocinina influencia na divisão celular e na liberação das gemas axilares inibidas pela dominância apical. A citocinina é considerada muito eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies lenhosas (CORDEIRO et al., 2004).

No entanto, para a *A. sessilis*, as concentrações de BAP utilizadas no meio de cultura demonstraram baixa proliferação de brotos, sendo registrado um aumento para taxa de multiplicação dos explantes à medida que adicionou-se maiores concentrações de citocinina ao meio de cultura. Esses resultados indicam que é necessário testar maiores concentrações de citocinina e outras citocininas a fim de se estabelecer um balanço hormonal interno que aumente o número de brotos formados em segmentos nodais de *A. sessilis*.

3.5 Indução de calos em explantes foliares

Explantes foliares de *A. sessilis* tratados com diferentes concentrações de 2,4-D formaram calos com características organogênicas e coloração variando entre verde-amarelada e amarelo-marrom. Houve a regeneração de raízes nesses calos, mas a mesma não foi significativa. Para os tratamentos acrescidos de diferentes concentrações de Picloram, os explantes foliares apresentaram calos com consistência predominantemente compacta e coloração verde esbranquiçada (Figura 6, 7 e 8).

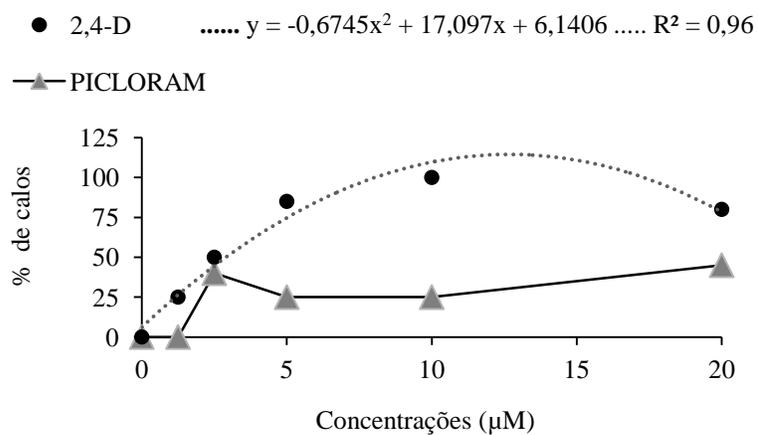


Figura 6: Porcentagem de formação de calos em explantes foliares cultivados em diferentes concentrações de 2,4-D e Picloram (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 μM).

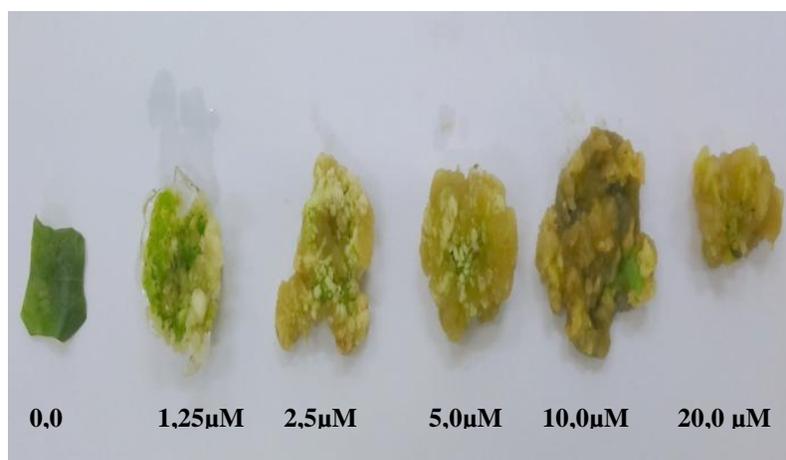


Figura 7: Aspecto visual de calos cultivados em diferentes concentrações de 2,4D (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 μM).

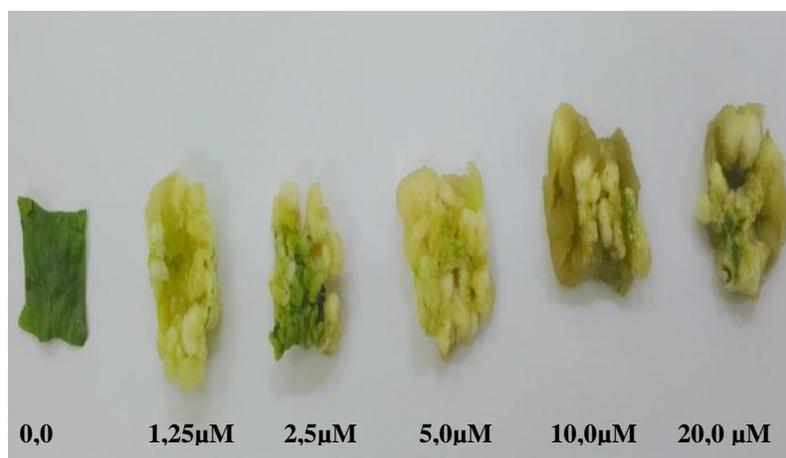


Figura 8: Aspecto visual de calos cultivados em diferentes concentrações de Picloram (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 μM).

A concentração considerada ótima de 2,4-D para formação de calos em explantes foliares é de 12,67 μM de 2,4-D, os dados referentes às concentrações de Picloram não se ajustaram a análise de regressão. Um equilíbrio no balanço hormonal deve haver para que ocorra a formação de calos, uma vez que, o balanço entre as quantidades de e auxinas endógenas e citocininas exógenas

podem diversificar de acordo com o tecido utilizado como explante (BRUNETTA et al., 2006; GUERRA; NODARI, 2006).

Para explantes foliares de *A. sessilis* o aumento na concentração de ácido 2,4-D até 10 μM proporcionou a porcentagem de 100% de explantes com formação de calos. Porém, ao se adicionar 20 μM de 2,4-D ao meio de cultura, observou-se uma redução de 20% em relação à utilização de 10 μM de 2,4-D. Indicando que essa concentração inibiu a formação de calos nos explantes de *A. sessilis*, essa inibição ocorreu devido ao desbalanço hormonal entre os reguladores de crescimento endógenos e o exógenos que foram aplicados.

Enquanto 20 μM de Picloram proporcionaram 45% de formação de calos em explantes foliares de *A. sessilis*. Portanto em explantes foliares de *A. sessilis* o 2,4-D proporcionou melhores respostas na porcentagem de formação de calos quando comparado com as mesmas concentrações de Picloram.

3.6 Indução de calos em ápices caulinares

A formação de calos em ápices de *A. sessilis* foi observada com 30 dias de inoculação, sendo que a concentração 5,0 μM de 2,4-D proporcionou a porcentagem de 100% de formação de calos compactos de coloração amarela claro. Para indução de calos em ápices caulinares de *A. sessilis* a concentração ótima estimada é de 12,42 μM de 2,4-D (Figura 9 e 10).

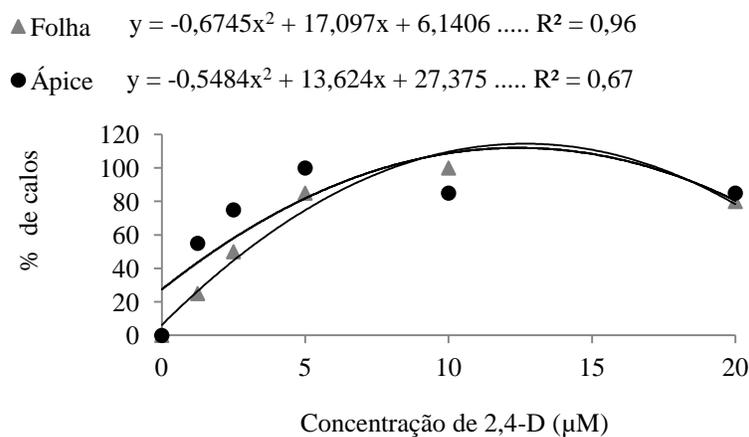


Figura 9: Porcentagem de formação de calos em ápices caulinares e em explantes foliares de *A. sessilis* cultivados em meio de cultura, acrescido de diferentes concentrações de 2,4-D (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 µM).

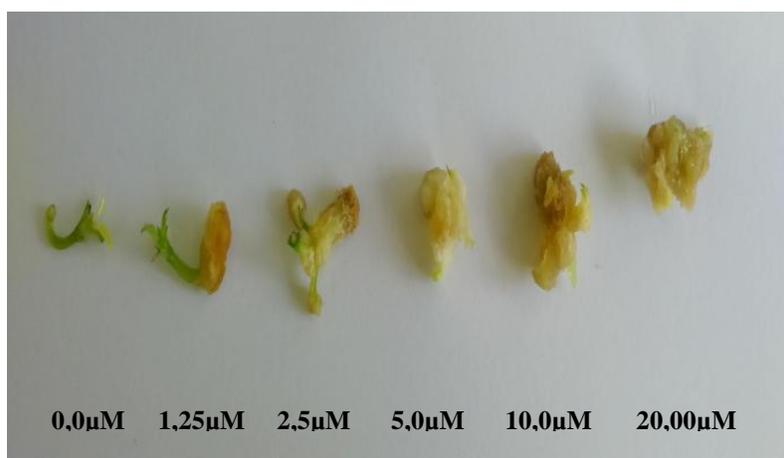


Figura 10: Aspectos visuais de calos em ápices caulinares de *A. sessilis* cultivados em diferentes concentrações de 2,4-D (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 µM).

As maiores concentrações (10,0 e 20,0 µM) de 2,4-D apresentaram uma redução de 15% na formação de calos, semelhante aos resultados encontrados em explantes foliares. A porcentagem de 100% de formação de calos em ápices caulinares ocorreu na concentração de 5,0 µM de 2,4-D, em explantes foliares

foi na concentração de 10,0 μM de 2,4-D. Assim a concentração ótima estimada para ambos os explantes é próxima. Sendo que para indução de calos em ápices caulinares de *A. sessilis* a concentração ótima estimada é de 12,42 μM de 2,4-D e para indução de calos em segmentos foliares é de 12,67 μM de 2,4-D.

O constituinte mais crítico adicionado ao meio de cultura são os reguladores de crescimento vegetal. Visto que, a obtenção de organogênese *in vitro* é um processo experimental onde são testados, para cada espécie ou mesmo para cada variedade dentro de uma espécie, a fonte de explante, composição mineral do meio de cultura, balanço hormonal e condições ambientais (PERES, 2002). Desse modo, a relação entre concentrações de citocininas e auxinas endógenas e exógenas é um fator de suma importância para que ocorra a formação de calos (BRUNETTA et al., 2006; GUERRA; NODARI, 2006; PERES, 2002).

4 CONCLUSÕES

Embora sejam precisos mais estudos, os resultados encontrados dão indícios da possibilidade de realizar a caracterização da espécie.

As sementes de *A. sessilis* apresentam umidade de 31,16%, as quais são classificadas como amiláceas devido seu conteúdo de amido 16%.

A germinação in vitro de sementes de *A. sessilis* foi de 93% em meio de cultivo MS.

Para a indução de brotos em segmentos nodais de *A. sessilis* a concentração ótima estimada foi de 8,0 μM de BAP.

Sugere-se a concentração de 12,67 μM de 2,4-D para indução de calos em segmentos foliares de *A. sessilis* e para ápices caulinares a concentração de 12,42 μM de 2,4-D.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L. M. S.; CAMARGO, A. J. A. **Cerrado: ecologia e caracterização**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2004. 249 p.
- ALBUQUERQUE, M. C. F.; RODRIGUES, T. de J. D.; MENDONÇA, E. A. F. Absorção de água por sementes de *Crotalaria spectabilis* Roth determinada em diferentes temperaturas e disponibilidade hídrica. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 206-215, 2000.
- AMARAL, L. I. V.; PEREIRA, M. F. D. A.; CORTELAZZO, O. A. L. Formação de substâncias de reserva durante o desenvolvimento de sementes de Urucum (*Bixa orellana* / Bixaceae). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 125-132, 2001.
- ANASTÁCIO, M. R.; SANTANA, D. G. Características germinativas de sementes de *Ananas ananassoides* (Baker) L. B. Sm. (Bromeliaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 195-200, 2010.
- ANDRADE, R. A.; JESUS, N.; MARTINS, A. B. G. Embebição e germinação de sementes de Camu-camu. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 4, p. 499-501, out./dez. 2006.
- APPROBATO, A. U.; GODOY, S. A. P. Levantamento de diásporos em áreas de cerrado no Município de Luiz Antônio. **Hoehnea**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 385-401, 2006.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Agricultural Chemists**. 17th ed. Gaithersburg, 2000. v. 2, 684 p.
- BARREIRO, D. P.; MACHADO, S. R. Coléteres dendróides em *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum., uma espécie não-nodulada de Rubiaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 387-399, jul./set. 2007.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2nd ed. New York: Plenum, 1994. 445 p.
- BORGES, R. C. F. et al. Caracterização da curva de embebição de sementes de pinhão-manso. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, Garça, v. 8, n. 13, p. 1-8, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDP/DNDV/CLAV, 2009. 395 p.

BRUNETTA, J. M. F. C. et al. Calogênese *in vitro* em segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia macrophylla* King) com uso de 6- benzilaminopurina e ácido α -naftalenoacético. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 71, p. 19-24, ago. 2006.

CARDOSO, V. J. M. Germinação. In: KERBAUY, G. B. (Ed.). **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004. cap. 17, p. 386-407.

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

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

CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 51-67.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. rev. Campinas: UNICAMP, 2003. 202 p.

CHAMAS, C. C.; MATTHES, L. A. F. Método para levantamento de espécies nativas com potencial ornamental. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 6, n. 1/2, p. 53-63, 2000.

CORDEIRO, I. M. C. C. et al. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (Paricá). **Cerne**, Lavras, v. 10, n. 1, p. 118-124, jan./jun. 2004.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323 p.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statical analysis system. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. de. **Plant propagation by tissue culture**. 3th ed. Dordrecht: The Background-Springer, 2008. v. 1, 520 p.

GIBSON, S. I. Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 395, p. 253-264, Jan. 2004.

GREGORIO, S. R.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Fibras alimentares e doença cardiovascular. **Nutire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, São Paulo, v. 22, p. 109-120, dez. 2001.

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 561-584, 2003.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Apostila de biotecnologia**. Florianópolis: Steinmacher, 2006. Disponível em: <<http://www.lfdgv.ufsc.br/Apostila%20Biotecnologia.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2015.

GUTKOSKI, L. C.; TROMBETTA, C. Avaliação dos teores de fibra alimentar e de beta-glicanas em cultivares de aveia (*Avena sativa* L). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 3, p. 387-390, set./dez. 1999.

HEIDEN, G.; ROSA LÍA BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. Considerações sobre o uso de plantas ornamentais nativas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 12, n. 1, p. 2-7, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapa de biomas e vegetação**. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

KAMER, V. S. B.; GINKEL, V. L. Rapid determination of crude fiber in cereals. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 19, n. 4, p. 239-251, 1952.

LOBO, A. R.; SILVA, G. M. L. Implicações nutricionais no consumo de fibras e amido resistente. **Nutrição em Pauta**, São Paulo, jan./fev. 2001. Disponível em: <http://www.nutricaoempauta.com.br/lista_artigo.php?cod=82>. Acesso em: 10 out. 2015.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002. v. 2, 383 p.

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

MATHEUS, M. T.; BACELAR, M.; OLIVEIRA, S. A. S. Descrição morfológica de frutos e sementes de Marmelinho-do-campo - *alibertia sessilis* schum. - (rubiaceae). **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 21, n. 3, p. 60-61, dez. 2008.

MATTOS, L. L.; MARTINS, I. S. Consumo de fibras alimentares em população adulta. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 50-55, fev. 2000.

MERCIER, H.; NIEVOLA, G. B. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: high tech and micropropagation**. New York: Springer, 2003. p. 43-57.

MORAIS, T. P. et al. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Arevised médium for rapid growth and biomassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-479, 1962.

MYERS, N. R. A. et al. Biversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, n. 6772, p. 853-858, Feb. 2000.

NASCIMENTO, W. M. O.; NOVEMBRE, A. D. L. C.; CICERO, S. M. Conseqüências fisiológicas da dessecação em sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mrt.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 38-43, 2007.

NELSON, N. A. Photometric adaptation of somogy method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemists**, Baltimore, v. 153, n. 1, p. 375-384, 1944.

NERY, F. C. et al. Caracterização morfológica e química de sementes de *Calophyllum brasiliense* Cambess. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 144-146, jul. 2007. Suplemento.

NUNES, M. C. et al. Vegetable proteins and milk puddings. **Colloid Surface B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 31, n. 1/4, p. 21-29, Sept. 2003.

OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. **The Cerrados of Brazil ecology and natural history of a Neotropical Savanna**. New York: Columbia University Press, 2002. 368 p.

PERES, L. E. P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 25, p. 44-48, mar./abr. 2002.

PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos de tecidos em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, jul. 2011.

RODRIGUES, A. P. C. et al. Absorção de água por semente de salsa, em duas temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 49-54, 2008.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio cerrado na região do Alto Rio Grande, Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 102-123, jan./fev. 2001.

SILVA, D. B. et al. **Frutas do Cerrado**. Brasília: EMBRAPA, 2001. 178 p.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2002. 235 p.

SILVA, F. A. B.; PEREIRA, L. A. R.; SILVEIRA, C. E. S. Micropropagation of *Alibertia edulis* Rich. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 51, n. 6, p. 1103-1114, Nov./Dec. 2008.

ARTIGO II

CRIOPRESERVAÇÃO DE *Alibertia sessilis* Shum

CRIOPRESERVAÇÃO DE *Alibertia sessilis* Shum

MARISA TANIGUCHI SARTO^{1*}, PATRÍCIA DUARTE DE OLIVEIRA PAIVA², MICHELE VALQUÍRIA REIS³, DIOGO PEDROSA CORRÊA DA SILVA⁴, FERNANDA CARLOTA NERY⁵, RENATO PAIVA⁶.

1 Mestranda em Agronomia/Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras/UFLA.

2 Dra., Professora Titular, Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras/ UFLA

3.Pós doutoranda em Agronomia/Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras/ UFLA

4 Pós doutorando em Agronomia/Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras/ UFLA

5 Dra., Professora Adjunta, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras/ UFLA.

6 PhD, Professor Titular, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras/UFLA

*Correspondência: Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras/UFLA Caixa Postal 3037 Campus Universitário 37.200-000 Lavras - MG. Email para correspondência: marisatst@hotmail.com

RESUMO

A criopreservação é considerada um método que faz o uso de temperaturas ultra baixas para armazenamento de materiais biológicos. Atualmente é o método que melhor garante o armazenamento em longo prazo de germoplasma, sendo indicado para diversas espécies. A *A. sessilis* é uma espécie que se destaca por apresentar potencial alimentício, medicinal e ornamental, porém o seu habitat natural o Cerrado é constantemente ameaçado, o que coloca a mesma em risco. Objetivou-se estabelecer o protocolo de criopreservação para *A. sessilis*. Para realização da criopreservação, o teor de água das sementes foi determinado previamente. Após a assepsia as sementes foram colocadas para desidratar em sílica gel por diferentes períodos (0, 15, 30, 60 e 90 min. de desidratação). Posteriormente, as sementes foram imersas em nitrogênio líquido por 30 min., após esse período foram retiradas e levadas ao banho Maria a 40 °C por 3 min. e depois foram inoculadas em meio de cultivo MS. Como controle, sementes foram inoculadas após cada tempo de desidratação em sílica gel, sem a imersão em nitrogênio líquido. Após 30 dias foi avaliada a porcentagem de sobrevivência das sementes. Para a criopreservação de embriões zigóticos, após a assepsia das sementes os embriões foram excisados e isolados com o auxílio de bisturi. Os embriões foram então imersos em solução de carregamento contendo 2,0 M de glicerol e 0,4 M de sacarose por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foram avaliados a imersão em solução de PVS2 (30% de glicerol (p/v), 15% etileno glicol (p/v) e 15% dimetilsulfóxido (DMSO p/v), 0,4 M de sacarose) em meio de cultura basal, a 0 °C por diferentes períodos (0, 15, 30, 60 e 120

minutos). Os embriões foram acomodados em tiras de papel alumínio (1,5 x 0,5 cm) com uma gota de solução de PVS2, sobre uma superfície gelada antes da imersão em NL. Como tratamento controle utilizou-se embriões não imersos em NL. Após 30 minutos em NL, foi realizado o reaquecimento por 15 minutos à temperatura ambiente em solução de descarregamento e, então, os embriões foram inoculados no meio MS contendo 0,3 M de sacarose (meio de pós-cultivo) por 24 h horas. Após este período, os explantes foram transferidos para o meio MS acrescido de 0,5 g L⁻¹ PVP, 0,09 M de sacarose, gelificado com 7 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. Após 30 dias, foi avaliada a porcentagem de germinação dos embriões. As sementes e embriões de *A. sessilis* não suportaram o resfriamento em NL. A exposição em PVS2 foi tóxica para os embriões. Portanto são necessários novos estudos para a conservação em longo prazo desta espécie.

Palavras-Chave: Criopreservação. Cerrado. Ornamental. Medicinal.

ABSTRACT

Cryopreservation is considered a method that makes the use of ultra-low temperatures to store biological materials. It is a long-term preservation method suitable for species considered of commercial interest and or endangered. The *A. sessilis* is a species that fits this profile. The objective was to establish the cryopreservation protocol for *A. sessilis*. For realization of cryopreservation, the seed moisture content was determined in advance. After sterilization the seeds were placed on silica gel to dehydrate for different periods (0, 10, 30, 60 and 90 minutes of dehydration). Then the seeds were immersed in liquid nitrogen for 30 minutes and then inoculated in MS medium. As control, seeds were inoculated after each time the silica gel dehydration, without immersion in liquid nitrogen. After 30 days were evaluated the percentage of survival of seeds. For cryopreservation of zygotic embryos, after the sterilization of seeds, embryos were excised and isolated with the aid of a scalpel. The embryos were then immersed in loading solution containing 2.0 M glycerol and 0.4 M sucrose for 20 minutes at room temperature. Then were evaluated immersion in PVS2 solution (30% glycerol (w / v) ethylene glycol 15% (w / v) and 15% dimethylsulfoxide (DMSO w / v), 0.4 M sucrose in medium basal culture at 0 ° C for different time periods (0, 15, 30, 60 and 120 minutes). The embryos were placed in aluminum foil (1.5 x 0.5 cm) with a PVS2 solution droplet on a cold surface before immersion in NL. As control treatment was used embryos not immersed in NL. After 30 minutes in NL, reheating was performed for 15 minutes at room temperature unloading solution and then the embryos were inoculated in MS medium containing 0.3 M sucrose medium (post-culture) for 24 h hours. After this period, the explants were transferred to MS medium supplemented with 0.5 g L⁻¹ PVP, 0.09 M sucrose, gelled with 7 g L⁻¹ agar, and adjusted to pH 5.8 before autoclaving. After 30 days, it evaluated the percentage of germination of the embryos. Seeds and embryos of *A. sessilis* not stand freezing in LN. The exhibition to PVS2 was toxic to embryos. So further studies are needed for long-term conservation of this species.

Keywords: Cryopreservation. Cerrado. Ornamental. Medicinal

1 INTRODUÇÃO

A criopreservação é um dos métodos para a conservação em longo prazo mais utilizados, tendo apresentado êxito em várias espécies de plantas (ENGELMANN, 2004). Esse método é caracterizado pelo uso de temperaturas ultra-baixas, geralmente com conservação em nitrogênio líquido a -196 °C, para armazenamento de materiais biológicos, tais como células viáveis, sementes, embriões etc., de modo que esse material poderá continuar capaz de se regenerar após o reaquecimento (BENSON, 2008; ENGELMANN, 2004; REED, 2011; UCHENDU et al., 2010).

Uma das técnicas da criopreservação que utiliza solução de vitrificação é a *droplet vitrification*, onde os explantes são imersos em solução de vitrificação antes que estes sejam alocados em tiras de papel alumínio, para só então serem imersos em nitrogênio líquido (ENGELMANN, 2011; PANNIS; PIETTE; SWENNEN, 2005). A *droplet vitrification* tem sido utilizada com sucesso para muitas espécies, principalmente para espécies que se encontram em biomas ameaçados como o Cerrado (PILATTI et al., 2011).

Entre as espécies nativas do Cerrado a *Alibertia sessilis* Schum destaca-se, por apresentar grande potencial para o mercado alimentício, farmacêutico e ornamental (RODRIGUES; CARVALHO, 2001). *A. sessilis*, conhecida como marmelada-de-cachorro, pertence à família das Rubiáceas e está distribuída nos estados do Ceará, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais e São Paulo. Nos últimos anos a busca pela conservação e divulgação de espécies nativas do Cerrado, tornou a *A. sessilis* uma espécie indicada para arborização de espaços públicos (LORENZI, 2002; SILVA et al., 2006). Porém, devido a constante devastação do seu bioma essa espécie tem se tornada rara. Dessa forma, são necessários estudos que visam o estabelecimento de protocolos para a

conservação a longo prazo. Portanto objetivo-se estabelecer um protocolo de criopreservação de *A. sessilis*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas sementes com 30 dias de armazenamento a 5 °C derivadas de frutos maduros de *A. sessilis*, provenientes da cidade de Sacramento, Minas Gerais. O local da coleta localiza-se a uma latitude 19° 51'55'' sul e a uma longitude 47° 26'24'' oeste, estando a uma altitude de 832 metros, o bioma característico é Cerrado sensu stricto e o solo apresenta uma terra clara arenosa.

2.1 Teor de água de sementes

Para determinação do teor de água das sementes, o peso fresco das sementes foi determinado. Em seguida foi realizada a desidratação em sílica gel nos períodos de 0, 15, 30, 60 e 90 minutos a 25 °C sendo realizada após cada período a pesagem das sementes. Para cada período de desidratação foram utilizadas 3 repetições contendo 10 sementes cada. Posteriormente as sementes foram secas em estufa a 70 °C durante 72 horas, sendo verificado a partir de então o peso constante das mesmas. Os teores de água foram expressos em porcentagem.

2.2 Criopreservação de sementes por desidratação em sílica gel

2.2.1 Material Vegetal e desinfestação

Foi realizada a assepsia das sementes em câmara de fluxo laminar, por imersão em álcool etílico a 70% durante um minuto. Subsequentemente as sementes foram transferidas para solução de hipoclorito de sódio comercial

(2,5% de cloro ativo) durante 15 minutos, acrescidos de 2 gotas de Tween 20. Em seguida, as sementes foram lavadas em triplicata com água destilada estéril.

2.2.2 Desidratação

Após assepsia, para a desidratação as sementes foram colocadas em sílica gel por diferentes períodos (0, 15, 30, 60 e 90 min. de desidratação) e posteriormente foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, gelificado com 2,5 g L⁻¹ de phytigel. Foram utilizadas 3 repetições por tratamento, contendo 10 sementes cada.

2.2.3 Criopreservação

Para a criopreservação as sementes foram desidratadas por diferentes períodos (0, 15, 30, 60 e 90 min. de desidratação), posteriormente levadas ao nitrogênio líquido por 30 min., após esse período foram retiradas e levadas ao banho Maria a 40 °C por 3 min. e depois inoculadas em meio de cultivo MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, gelificado com 2,5 g L⁻¹ de phytigel. Foram utilizados 3 repetições por tratamento, contendo 10 sementes cada.

2.2.4 Condições de Crescimento

As condições de cultivo foram: temperatura de 25 ± 2 °C, 80% de umidade relativa, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 36 μmol m⁻² s⁻¹. Após 30 dias foi avaliada a sobrevivência das sementes.

2.3 Criopreservação de embriões zigóticos via *droplet vitrification*

Em câmara de fluxo laminar, após a assepsia das sementes os embriões foram excisados e isolados com o auxílio de bisturi. Para a criopreservação, os embriões foram imersos na solução de carregamento (2,0 M de glicerol e 0,4 M de sacarose dissolvida em meio MS) por 20 minutos à temperatura ambiente.

Em seguida foi realizada a imersão em solução de PVS2 (30% de glicerol (p/v), 15% etileno glicol (p/v) e 15% dimetilsulfóxido (DMSO p/v), 0,4 M de sacarose) em meio de cultura basal, a 0 °C por diferentes períodos de tempos (0, 15, 30, 60 e 120 minutos). Os embriões foram acomodados em tiras de papel alumínio (1,5 x 0,5 cm) com uma gota de solução de PVS2, sobre uma superfície gelada antes da imersão em NL. Como tratamento controle utilizou-se embriões não imersos em NL (não passaram pela etapa de criopreservação).

Após 30 minutos em NL, foi realizado o reaquecimento por 15 minutos à temperatura ambiente em solução de descarregamento (1,2 M de sacarose dissolvida em meio MS) e, então, os embriões foram inoculados no meio MS contendo 0,3 M de sacarose (meio de pós-cultivo) por 24 horas. Após este período, os embriões foram transferidos para o meio MS acrescido de 0,5 g L⁻¹ PVP, 0,09 M de sacarose, gelificado com 7 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. Foram utilizados 3 repetições por tratamento, contendo 15 embriões cada.

2.3.1 Condições de Crescimento

As condições de cultivo foram: temperatura de 25 ± 2 °C, 80% de umidade relativa, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 36 μmol m⁻² s⁻¹. Após 30 dias foi avaliada a sobrevivência dos embriões.

2.4 Análises Estatísticas

Os dados obtidos nos diferentes experimentos foram submetidos à análise de variância, para diagnóstico de efeito significativo pelo teste “F” as médias obtidas foram ajustadas a análise de regressão e as equações foram escolhidas de acordo com o coeficiente de determinação (R²) no programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teor de água das sementes

As sementes apresentaram um teor de água de 34%, sendo observada uma redução no teor de água em função do tempo de exposição em sílica gel, chegando a 26% aos 90 minutos de desidratação (Tabela 1).

Tabela 1: Teor de água em sementes *A. sessilis*, após a desidratação por diferentes períodos (minutos) em sílica gel.

Tempo de desidratação (min.)	Teor de água (%)
0	34,40
15	33,17
30	30,70
60	30,68
90	26,43

As sementes de *A. sessilis* após desidratação, apresentaram a porcentagem de sobrevivência em ordem decrescente de acordo com o tempo de exposição em sílica gel (Figura 1). Existem algumas espécies que ao serem desidratadas, perdem rapidamente a viabilidade, para essas sementes consideradas recalcitrantes ou intermediárias, a desidratação pode levar a morte do embrião. Dessa forma, o alto teor de água das sementes pode ser uma das principais causas da perda do poder germinativo durante o armazenamento (DESAI; KOTECHA; SALUNKHE, 1997; MEDEIROS; EIRA, 2006).

A secagem em sílica gel é considerada, muitas vezes, como rápida (JOSÉ et al., 2009; PEREIRA et al., 2012). No entanto, observou-se que as sementes de *A. sessilis* desidratadas por 15, 30 e 60 min. apresentaram baixa

diferença na porcentagem de sobrevivência, permanecendo entre 100, 93 e 93%, enquanto, aos 90 min, a porcentagem de teor de água de 34,40% caiu para 26, 43% uma diferença de 7,97%, essa diferença foi suficiente para a queda de 64% na sobrevivência das sementes, quando comparadas ao tempo 0 min. de desidratação.

Assim, leva-se em consideração o teor de água de segurança, que corresponde à umidade que pode ser atingida com a desidratação, sem prejuízos à viabilidade das sementes, o teor de água crítico refere-se ao grau de umidade no qual é detectado o início da perda de viabilidade e o teor letal de água, significa o limite abaixo do qual todas as sementes perdem a viabilidade para cada espécie. Entretanto a capacidade das sementes em tolerar dessecação varia de acordo com a espécie e a origem dos lotes (DESAI; KOTECHA; SALUNKHE, 1997; GROOT et al., 2003; HONG; ELLIS, 1996). Diante disso, pôde-se observar que o teor de água das sementes de *A. sessilis*, após a desidratação, manteve-se na faixa do grau de umidade crítico, sugerindo se assim um comportamento característico de sementes recalcitrantes.

3.2 Criopreservação de sementes por desidratação em sílica gel

As sementes de *A. sessilis* expostos à desidratação e não criopreservadas apresentaram uma queda na porcentagem de sobrevivência, em 0 min. de desidratação a sobrevivência foi de 100%, enquanto aos 90 min. de desidratação a sobrevivência foi de 63%. Em relação à criopreservação as sementes não sobreviveram (Figura 1 e 2A e 2B).

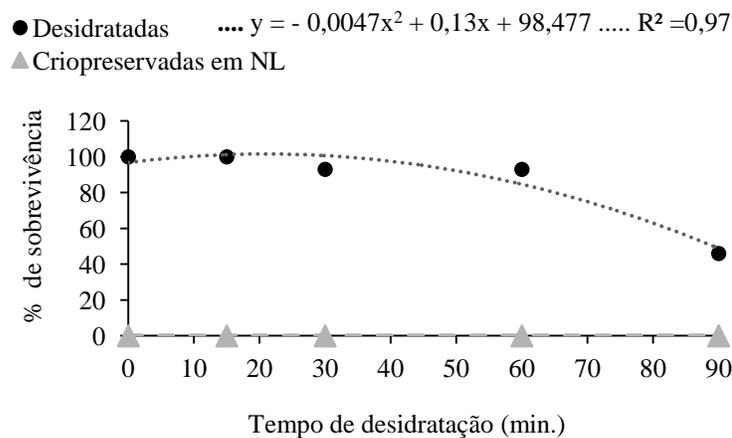


Figura 1: Porcentagem de sobrevivência de sementes de *A. sessilis* desidratadas e desidratadas e posteriormente criopreservadas (Criopreservadas em NL).

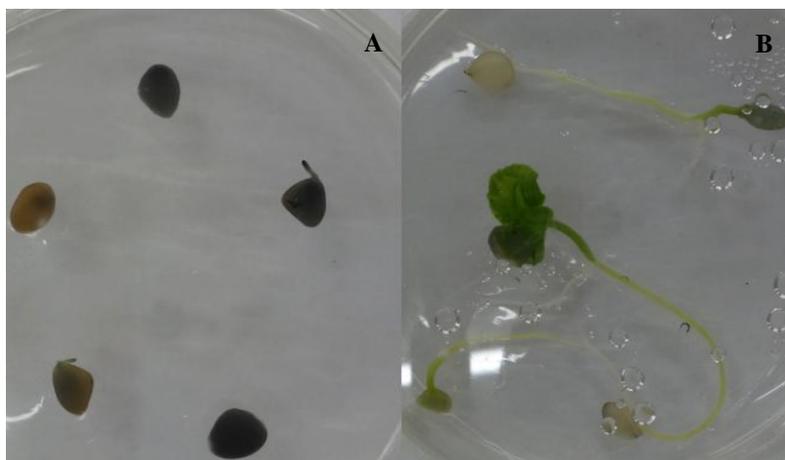


Figura 2 A e 2 B: Aspecto visual de: sementes de *A. sessilis* após 30 dias de criopreservação (15 min. de desidratação) (A). E plântulas de *A. sessilis* após 30 dias da desidratação (15 min. de desidratação) (B).

Observou-se nas sementes não criopreservadas que a perda de água promovida pela desidratação afetou o potencial germinativo e a sobrevivência das mesmas. Em razão de, que aos 90 min. de exposição à sílica gel, o teor de água foi reduzido a 26,43% o que promoveu uma redução de 64% na

sobrevivência quando comparadas com as sementes não desidratadas (0 min.) que apresentaram 100% de sobrevivência. Dessa forma, o presente estudo sugere que sementes de *A. sessilis* apresentaram comportamento recalcitrante quanto à tolerância à desidratação, verificado pela redução da sobrevivência das sementes com teor de água abaixo de 30%. Sendo que, as sementes recalcitrantes não toleram a perda de água e sofrem danos em diferentes níveis durante a desidratação (PAMMENTER; BERJAK, 1999).

Para as sementes desidratadas e criopreservadas não houve sobrevivência das mesmas. Várias espécies não toleram condições de grande redução de temperatura, principalmente o congelamento. Pelo fato da água contida nas sementes pode propiciar a formação de cristais de gelo, acarretando rupturas mecânicas na parede celular e no sistema de membranas, o que pode promover a desagregação celular e a conseqüente perda da viabilidade das sementes (HELLMANN et al., 2006).

O alto teor de água intracelular das sementes (34,40%) provavelmente promoveu a formação de cristais de gelo quando foram expostas a baixas temperaturas, provocando a morte das mesmas. Além disso, observou-se escurecimento das sementes após a criopreservação, possivelmente esse escurecimento ocorreu devido ao estresse oxidativo, que por sua vez é um dos fatores que afetam o estágio da recuperação após o processo de criopreservação (CHEN et al., 2015).

A desidratação é uma etapa importante para elaboração de protocolos eficazes de criopreservação (ENGELMANN, 2011; GONZALEZ-ARNAO et al., 2008; PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005). O teor de água das sementes pode ilustrar o comportamento desta espécie quanto à tolerância à desidratação, sugerindo um comportamento recalcitrante em sementes de *A. sessilis*. Assim, os resultados de sobrevivência obtidos com os tempos de desidratação em sílica gel

apresentam potencial para uso em futuros trabalhos de criopreservação em sementes de *A. sessilis*, uma vez que, ainda são incipientes estudos na literatura.

3.3 Criopreservação de embriões zigóticos via *Droplet Vitrification*

Tantos os embriões de *A. sessilis* expostos ao PVS2 não criopreservados quanto os embriões que não foram expostos ao PVS2, apresentaram baixa porcentagem de sobrevivência (20%). Em relação aos embriões criopreservados em NL não houve sobrevivência dos mesmos (Figura 3, 4A e 4B).

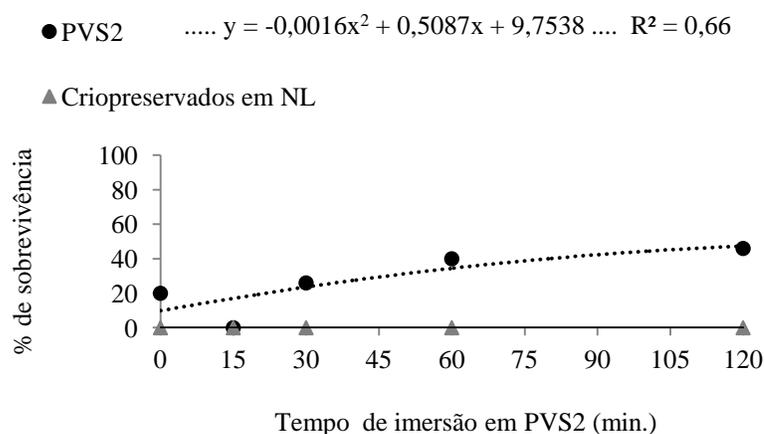


Figura 3: Porcentagem de sobrevivência de embriões de *A. sessilis* exposto ao PVS2 e não criopreservados (PVS2) e porcentagem de sobrevivência de embriões de *A. sessilis* expostos ao PVS2 e criopreservados (Criopreservados em NL).

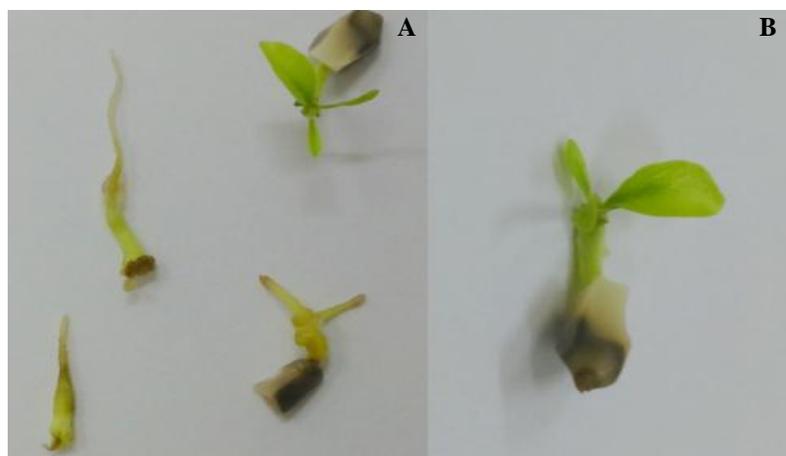


Figura 4A e 4B: Aspecto visual de embriões de *A. sessilis* com 15 dias de cultivo após o tratamento de tempo de exposição em PVS2: Desenvolvimento desuniforme (A e B).

A maior porcentagem de sobrevivência obtida dos embriões desidratados e não criopreservados foi de 46% aos 120 minutos de exposição ao PVS2, além da toxicidade do PVS2, pode se considerar a ocorrência de danos sofridos ao embrião no momento da excisão ou mesmo no tempo em que o processo foi realizado. Vários são os fatores que afetam ou limitam a germinação e regeneração dos embriões zigóticos de espécies sensíveis à desidratação e congelamento em nitrogênio líquido, devido à complexidade e sensibilidade dos tecidos que compõem o embrião (ENGELMANN, 2011).

Não houve sobrevivência dos embriões submetidos à desidratação e criopreservação. Os procedimentos de desidratação e criopreservação em NL, possivelmente, causaram alterações e danos nas células dos embriões zigóticos de *A. sessilis*. Estas alterações podem ocorrer em diversas organelas, vindo a comprometer o metabolismo do embrião (SERSHEN et al., 2012). Visto que, a redução de água dos eixos embrionários em um nível possível de submetê-lo à temperatura do nitrogênio líquido e/ou evitar a formação de cristais de gelo é o

passo mais crítico na obtenção de um protocolo viável de criopreservação (LOPES et al., 2013).

4 CONCLUSÕES

As sementes e os embriões de *A. sessilis* não sobreviveram à criopreservação em nitrogênio líquido.

As sementes e embriões da *A. sessilis* sobreviveram à desidratação. Tais resultados sugerem que a desidratação em sílica gel e imersão em solução crioprotetora apresentam potencial para adaptação de outras metodologias de criopreservação.

Dessa forma, novos estudos utilizando outras técnicas como o encapsulamento dos embriões zigóticos ou a criopreservação de outros tipos de explantes como ápices caulinares devem ser realizados a fim de estabelecer protocolos de criopreservação eficientes para essa espécie.

REFERÊNCIAS

BENSON, E. E. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory and practice. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Abingdon, v. 27, n. 3, p. 141-219, 2008.

CHEN, G. Q. et al. Cryopreservation affects ROS-induced oxidative stress and antioxidant response in Arabidopsis seedlings. **Cryobiology**, San Diego, v. 70, n. 1, p. 38-47, Feb. 2015.

DESAI, B. B.; KOTTECHA, P. M.; SALUNKHE, D. K. **Seeds handbook biology, production, processing and storage**. New York: Basel, 1997. 627 p.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Wallingford, v. 40, n. 5, p. 427-433, 2004.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Wallingford, v. 47, n. 1, p. 5-16, Feb. 2011.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statical analysis system. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

GONZALEZ-ARNAO, M. T. et al. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 1-13, Jan. 2008.

GROOT, S. P. C. et al. Gene expression during loss and regaining of stress tolerance at seed priming and drying. In: NICOLÁS, G. et al. (Ed.). **The biology of seeds: recent research advances**. Cambridge: CAB International, 2003. p. 279-287.

HELLMANN, M. E. et al. Tolerância ao congelamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam) influenciada pelo teor de água inicial. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 93-101, 2006.

HONG, T. D.; LININGTON, S.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behaviour**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 55 p. (IPGRI Handbooks for Genebanks, 4).

JOSÉ, S. C. B. R. et al. Umidificação de sementes de girassol após ultrassecação em sílica gel e câmara de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 16-26, 2009.

LOPES, K. P. et al. Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de algodoeiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 3, p. 291-298, 2013.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. v. 3, 384 p.

MEDEIROS, A. C. S.; EIRA, M. T. S. **Comportamento fisiológico, secagem e armazenamento de sementes florestais nativas**. Colombo: EMBRAPA Florestas, 2006. 13 p. (Circular Técnica, 127).

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and biomass with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-479, 1962.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 9, n. 2, p. 13-37, 1999.

PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant Science**, Shannon, v. 168, n. 1, p. 45-55, 2005.

PEREIRA, W. V. S. et al. Desiccation tolerance of Tapirira obtusa seeds collected from different environments. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 388-396, 2012.

PILATTI, F. K. et al. *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Wallingford, v. 47, n. 1, p. 82-98, Feb. 2011.

REED, B. M. Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. **Cryo Letters**, Lewes, v. 22, n. 2, p. 97-104, Mar./Apr. 2011.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande, Minas

Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 102-123, jan./fev. 2001.

SERSHEN, B. et al. Rate of dehydration, state of subcellular organization and nature of cryoprotection are critical factors contributing to the variable success of cryopreservation: studies on recalcitrant zygotic embryos of *Haemanthus montanus*. **Protoplasma**, Wien, v. 249, n. 1, p. 171-186, 2012.

SILVA, V. C. et al. Isolation of lignans glycosides from *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. (Rubiaceae) by preparative high-performance liquid chromatography. **Eclética Química**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 55-58, 2006.

UCHENDU, E. S. et al. Vitamins, E improve growth and reduce lipid peroxidation of blackberry shoot tips following cryopreservation. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 29, n. 1, p. 25-35, Jan. 2010.

ARTIGO III

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE *Alibertia edulis* Rich
POR DESIDRATAÇÃO EM SÍLICA GEL**

CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE *Alibertia edulis* Rich POR DESIDRATAÇÃO EM SÍLICA GEL

MARISA TANIGUCHI SARTO^{1*}, PATRÍCIA DUARTE DE OLIVEIRA PAIVA², CAMILA VITÓRIA NUNES DE FARIA³, RAFAELA RIBEIRO SOUZA⁴, MAYARA CAROLINE CARVALHO PINTO⁵, RENATO PAIVA⁶.

1 Mestranda em Agronomia/Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras/UFLA.

2 Dra., Professora Titular, Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras/ UFLA

3 Doutoranda em Agronomia/ Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras/UFLA.

4 Doutoranda em Agronomia/ Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras/UFLA.

5 Mestranda em Agronomia/Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras/UFLA.

6 PhD, Professor Titular, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras/UFLA

*Correspondência: Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras/UFLA Caixa Postal 3037 Campus Universitário 37.200-000 Lavras - MG. Email para correspondência: marisatst@hotmail.com

RESUMO

A *A. edulis* é uma Rubiaceae nativa do Cerrado de interesse ornamental, medicinal e alimentício. No entanto esta sendo ameaçada devido a constante degradação do seu bioma. Sendo assim a criopreservação é uma alternativa para a conservação da espécie. Objetivou-se estabelecer a criopreservação de sementes de *A. edulis*. Para realização da criopreservação, o teor de água das sementes foi determinado previamente. Após a assepsia as sementes foram colocadas para desidratar em sílica gel por diferentes períodos (0, 10, 20, 40 e 60 min. de desidratação) após esse período as sementes foram retiradas e levadas ao banho Maria a 40 °C por 3 min.. Posteriormente, as sementes foram imersas em nitrogênio líquido por 30 min. e depois inoculadas em meio de cultivo MS. Como controle, sementes foram inoculadas em meio de cultivo MS após cada tempo de desidratação em sílica gel, sem a imersão em nitrogênio líquido. Após 30 dias foi avaliada a porcentagem de sobrevivência das sementes. Plântulas germinadas a partir das sementes criopreservadas, foram então aclimatizadas. Para obtenção de máxima sobrevivência de sementes *A. edulis*, após a criopreservação recomenda-se a desidratação em sílica gel por 73 minutos.

Palavras-Chave: Criopreservação. Semente. Cerrado. Medicinal.

ABSTRACT

The *A. edulis* is a native Rubiaceae from Cerrado of ornamental interest, medicinal and food. However it is being threatened due to constant deterioration of its biome. Therefore cryopreservation is an alternative for the conservation of the species. This study aimed to establish the cryopreservation of *A. edulis* seeds. For the realization of cryopreservation, the seed moisture content was determined in advance. After sterilization the seeds were dehydrated in silica gel for different periods (0, 10, 20, 40 and 60 minute dehydration) after this period, the seeds were removed and brought to water bath at 40 ° C for 3 minute . After that the seeds were immersed in liquid nitrogen for 30 minute and then inoculated in MS culture. As control, seeds were inoculated in MS medium after each time of the silica gel dehydration, without immersion in liquid nitrogen. After 30 days were evaluated the percentage of survival of seeds. Seedlings germinated from cryopreserved seeds were then acclimatized. To obtain maximal survival of *A. edulis* seed after cryopreservation it is recommended dehydration of silica gel for 73minute.

Keywords: Cryopreservation. Seed. Cerrado. Medicinal.

1 INTRODUÇÃO

A *A. edulis* pertence à família das Rubiaceae é uma espécie frutífera nativa do Cerrado de grande interesse econômico devido ao seu alto potencial alimentício, medicinal e ornamental (LORENZI, 2002; SILVA et al., 2011). A planta é uma árvore de pequeno porte, podendo atingir 3 metros de altura, apresenta flores brancas com florescimento de agosto a fevereiro. Seus frutos são consumidos tanto pela fauna como pelos nativos da região, seu uso pode ser *in natura* ou em forma mais elaborada como geleia, sucos e compotas (LORENZI, 2002; MARGALHO; ROCHA; SECCO, 2009).

O protocolo de micropropagação já foi estabelecido para essa espécie podendo assim ser propagada para facilitar o uso agrícola, farmacológico, ornamental ou na recuperação de áreas degradadas (SILVA; PEREIRA; SILVEIRA, 2008). No entanto espécies como *A. edulis* estão consideradas ameaçadas junto com o seu bioma natural o Cerrado, e de fato a conservação a longo prazo passa a ser de interesse para futuros estudos com esta espécie. A criopreservação é uma forma de conservação a longo prazo de material biológico em nitrogênio líquido a -196°C ou em sua fase de vapor a -150°C , que pode ser aplicada para a conservação de diferentes tipos de explantes (BENSON, 2008; ENGELMANN, 2004, 2011; SANTOS, 2004).

Assim, a criopreservação aparece como uma opção de baixo custo para a manutenção e conservação de germoplasma de espécies vegetais por períodos considerados indefinidos. Uma vez que, a mesma vem sendo muito utilizada, evitando-se assim o risco de extinção e permitindo que vários genótipos estejam disponíveis para utilização futura (FLORES et al., 2013; MUSTAFA; LAAKE; STEIN, 2011). Dessa forma, objetivo-se estabelecer a criopreservação de *A. edulis* a partir da desidratação em sílica gel.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas sementes com 30 dias de armazenamento a 5 °C derivadas de frutos maduros de *A. edulis*, provenientes de Sacramento, Minas Gerais. O local da coleta localiza-se a uma latitude 19° 51'55'' sul e a uma longitude 47° 26'24'' oeste, estando a uma altitude de 790 metros, o bioma característico é Cerrado Sensu Stricto e o solo arenoso.

2.1 Teor de água de sementes

Para determinação do teor de água das sementes foi verificado o peso fresco de 3 repetições contendo dez sementes cada. Em seguida foi realizada a desidratação em sílica gel nos períodos de 0, 10, 20, 40 e 60 min. a 25 °C, a partir de então, as sementes foram secas em estufa a 70 °C durante 72 horas. Os teores de água foram expressos em porcentagem.

2.2 Criopreservação de sementes por desidratação em sílica gel

2.2.1 Material Vegetal e desinfestação

Foi realizada a assepsia das sementes em câmara de fluxo laminar, por imersão em álcool etílico a 70% durante 1 min. Em seguida as sementes foram transferidas para solução de hipoclorito de sódio comercial (2,5% de cloro ativo) durante 15 min., acrescidos de duas gotas de Tween 20. Posteriormente as sementes foram lavadas três vezes com água destilada e autoclavada.

2.2.2 Desidratação

Após assepsia, para a desidratação as sementes foram colocadas em sílica gel por diferentes períodos (0, 10, 20, 40 e 60 min. de desidratação) e posteriormente foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, gelificado com 2,5 g L⁻¹ de phytigel. Foram utilizadas 3 repetições por tratamento, contendo 10 sementes cada.

2.2.3 Criopreservação

Para a criopreservação as sementes foram desidratadas por diferentes períodos (0, 10, 20, 40 e 60 min. de desidratação), posteriormente levadas ao nitrogênio líquido por 30 min., após esse período foram retiradas e levadas ao banho Maria a 40 °C por 3 min, em seguida foram inoculadas em meio de cultivo MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, gelificado com 2,5 g L⁻¹ de phytigel. Foram utilizados 3 repetições por tratamento, contendo 10 sementes cada.

2.2.4 Condições de Crescimento

As condições de cultivo foram: temperatura de 25 ± 2 °C, 80% de umidade relativa, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 36 μmol m⁻² s⁻¹. Após 30 dias foi avaliada a sobrevivência das sementes.

2.3 Aclimatização de plântulas

Após a avaliação de sobrevivência, plântulas normais foram subcultivadas em meio de cultivo MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e

geleificado com $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de phytigel. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, a $121 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 20 min.. Após a inoculação, as plântulas foram transferidas para sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, 80% de umidade relativa, fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Após 30 dias foram retiradas dos tubos, lavadas com água destilada para retirar o restante do meio de cultivo e plantadas em tubetes, com substrato comercial Tropstrato. Foram cobertas com plástico e após 10 dias o plástico foi retirado. Aos 30 dias de aclimatização, foi avaliada a porcentagem de sobrevivência e o número de folhas. Foram utilizadas 4 repetições contendo 3 plântulas cada.

2.4 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, para diagnóstico de efeito significativo pelo teste “F” às médias obtidas foram ajustadas a análise de regressão e as equações foram escolhidas de acordo com o coeficiente de determinação (R^2) no programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teor de água das sementes

As sementes de *A. edulis* apresentaram um teor de água de 17% após armazenamento de 30 dias a 5 °C. Após a desidratação em sílica gel por 60 min. observou-se uma queda significativa no teor de água permanecendo em 6,63% (Tabela 1).

Tabela 1: Teor de água em sementes *A. edulis*, após a desidratação por diferentes períodos (minutos) em sílica gel.

Tempo de desidratação (min.)	% de Umidade
0	16,90
10	10,82
20	9,12
40	7,40
60	6,63

A desidratação em sementes pode ser mediada por sistemas protetores que previnem danos letais em diferentes componentes celulares como membranas, proteínas e citoplasma (GUIMARÃES et al., 2002). A capacidade de recuperar as funções biológicas quando as sementes são reidratadas, após serem submetidas à desidratação artificial ou natural se refere ao grau de tolerância à desidratação de cada espécie, pode-se dizer que a tolerância de um organismo ao perder água dependerá da habilidade da célula de manter a integridade das membranas e prevenir a desnaturação de proteínas (MARCOS FILHO, 2005).

As sementes de *A. edulis* alcançaram o teor de água de 6,63 % aos 60 min. e apresetaram 63% de sobrevivência. Os resultados deste trabalho corroboram com os de Neves (2011) sugerindo que as sementes de *A. edulis* podem ser consideradas ortodoxas quanto à desidratação. Uma vez que, as sementes ortodoxas se mantêm viáveis até um teor de água em torno de 5% e a tolerância é adquirida progressivamente durante o seu desenvolvimento antes de sofrerem uma queda severa em seu conteúdo de água (BRANDÃO JÚNIOR et al., 2002; GUIMARÃES et al., 2002).

Outras características que também distinguem sementes do tipo ortodoxo foram observadas em sementes de *A. edulis* como o tamanho reduzido e o baixo conteúdo de água das sementes. Além disso, sementes ortodoxas apresentam taxas metabólicas e respiração mais baixa podendo ser armazenadas com baixos teores de água e sob baixas temperaturas por longo período de tempo (DAVIDE; CARVALHO; TONETTI, 2001; HONG; LININGTON; ELLIS, 1996; NEVES, 2011; PINTO; INOUE; NOGUEIRA, 2004).

3.2 Criopreservação de sementes pelo método de desidratação em sílica gel

As sementes de *A. edulis* submetidas à desidratação que foram expostas ao maior tempo em sílica gel, apresentaram os menores índices de sobrevivência. No entanto, no tratamento com nitrogênio líquido observou-se que as sementes expostas ao maior tempo de desidratação e que apresetaram menor teor de água foram as que também apresentaram maior porcentagem de sobrevivência após a criopreservação (Figura 1, 2A e 2B).

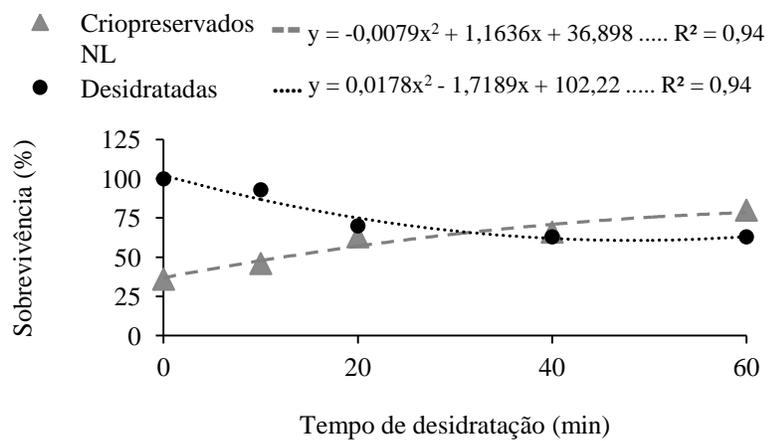


Figura 1: Porcentagem de sobrevivência de sementes de *A. edulis*: Criopreservadas e desidratadas.

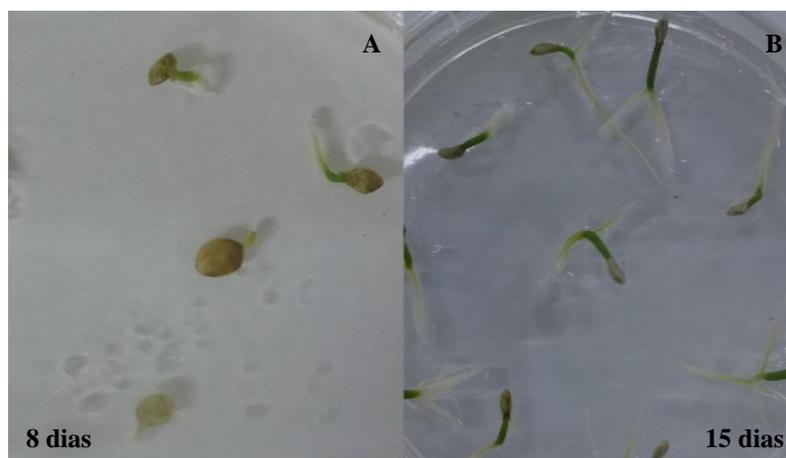


Figura 2A e 2B: Aspecto visual de sementes de *A. edulis* germinadas: Após 8 dias da criopreservação (60 min. de desidratação) (A). E germinadas após 15 dias da criopreservação (60 min. de desidratação) (B).

Observou-se que o aumento no tempo de desidratação das sementes de *A. edulis* em sílica gel possibilitou uma diminuição na porcentagem de sobrevivência quando não criopreservadas. No entanto, verificou-se que para o

processo de criopreservação a desidratação foi essencial para a maior porcentagem de sobrevivência das mesmas, notando-se, que o máximo de tempo estimado de até os 73 min. possibilita o máximo de sobrevivência. Isto indica que quanto maior o tempo de desidratação menor é o teor de água intracelular, (6,63%), assim com o menor teor de água intracelular pode se evitar a formação de cristais de gelo, que promovem a morte celular.

Porto et al. (2014), trabalhando com a criopreservação de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.), encontraram entre 6 e 9% de água nas sementes antes do armazenamento em nitrogênio líquido. O uso da criopreservação como uma ferramenta é de grande importância para o armazenamento de espécies selvagens e para preservação da diversidade genética. Posto que, a manutenção de germoplasma vegetal em coleções no campo apresenta uma série de problemas tais como erosão genética das espécies, pragas e doenças, além da mão de obra e espaço necessários (WINKELMANN; MUBMANN; SEREK, 2004).

3.3 Aclimatização de plântulas

Na fase de aclimatização, não foram observadas diferenças significativas para as variáveis analisadas, tanto entre os tratamentos de desidratação quanto para as sementes submetidas à criopreservação (Figura 3A e 3B).



Figura 3A e 3B: Aspecto visual das plantas de *A. edulis* desidratadas em sílica gel e não criopreservadas (A) e criopreservadas NL (B) após 30 dias de aclimatização.

Após subcultivo em meio de cultura MS por 30 dias, as plantas oriundas de ambos os tratamentos foram aclimatizadas com sucesso. Independentemente do tratamento de desidratação em sílica gel ou criopreservadas em nitrogênio líquido a porcentagem de sobrevivência das plântulas após a aclimatização foi superior a 80%, demonstrando que não houve danos severos durante os procedimentos de desidratação e resfriamento.

A porcentagem de sobrevivência foi em média de 83% para plantas desidratadas e de 82% para as plantas desidratadas e criopreservadas, foram encontradas em média 6 folhas por plântula, 5 cm de comprimento da parte aérea e 4 cm para o comprimento da raiz. Diante desses resultados podemos considerar que a criopreservação de sementes de *A. edulis* foi eficaz.

4 CONCLUSÃO

Para obtenção de máxima sobrevivência de sementes *A. edulis*, após a criopreservação recomenda-se a desidratação em sílica gel por 73min.

Conforme os resultados obtidos, os experimentos realizados contribuem para a conservação a longo prazo de *A. edulis*, possibilitando a criopreservação de sementes de *A. edulis* e a inserção da mesma em bancos de germosplasma.

REFERÊNCIAS

- BENSON, E. E. Criopreservation theory. In: _____. **Plant cryopreservation: a practical guide**. Corvallis: Springer, 2008. p. 15-32.
- BRANDÃO JUNIOR, D. S. et al. Tolerância à dessecação de sementes de Cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 24, n. 2, p. 17-23, 2002.
- DAVIDE, A. C.; CARVALHO, L. R.; TONETTI, O. A. O. Levantamento do grau de umidade de sementes de espécies florestais após beneficiamento. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 11, n. 2, p. 285-287, ago. 2001.
- ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Wallingford, v. 40, n. 5, p. 427-433, 2004.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Wallingford, v. 47, n. 1, p. 5-16, Feb. 2011.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statical analysis system. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.
- FLORES, R. et al. Sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 4, n. 3, p. 192-199, 2013.
- GUIMARÃES, R. M. et al. Tolerância à dessecação em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 1, p. 128-139, jan./fev. 2002.
- HONG, T. D.; LININGTON, S.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behaviour**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 55 p. (IPGRI Handbooks for Genebanks, 4).
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4. ed. Plantarum, 2002. v. 2, 384 p.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

MARGALHO, L. F.; ROCHA, A. E. S.; SECCO, R. S. Rubiaceae Juss. da restinga da APA de Algodual/Maiandeuá, Maracanã, Pará, Brasil. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Ciência Natura*, Belém, v. 4, n. 3, p. 303-339, set./dez. 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biomass with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-479, 1962.

MUSTAFA, Y. T.; LAAKE, P. E. van; STEIN, S. Modeling for improving forest growth estimates. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing. Bayesian Network*, New York, v. 49, n. 2, p. 639-649, 2011.

NEVES, E. M. S. **Secagem, armazenamento e condicionamento osmótico de sementes de frutíferas nativas do Cerrado**. 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2011.

PINTO, A. M.; INOUE, M. T.; NOGUEIRA, A. C. Conservação e vigor de sementes de pau-de-balsa (*Ochroma pyramidale*). *Acta Amazônica*, Manaus, v. 34, n. 2, p. 233-236, 2004.

PORTO, J. M. P. et al. Cryopreservation of seeds of barbatimão with different water contents. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, Amman, v. 8, n. 13, p. 534-537, 2014.

SANTOS, I. R. I. **Criopreservação de eixos embrionários de espécies de Citrus usando encapsulamento e desidratação**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 23 p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 115).

SILVA, D. G. et al. Physiological and biochemical properties changes during storage of *Tabebuia serratifolia* seeds. *Cerne*, Lavras, v. 17, n. 1, p. 1-7, 2011.

SILVA, F. A. B.; PEREIRA, L. A. R.; SILVEIRA, C. E. S. Micropropagation of *Alibertia edulis* Rich. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v. 51, n. 6, p. 1103-1114, Nov./Dec. 2008.

WINKELMANN, T.; MUBMANN, V.; SEREK, M. Cryopreservation of embryogenic suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 23, n. 6, p. 1-8, 2004.