



**RODRIGO THEREZAN DE FREITAS**

**CRIOPRESERVAÇÃO  
DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *Coffea arabica*  
POR VITRIFICAÇÃO**

**LAVRAS - MG  
2016**

**RODRIGO THEREZAN DE FREITAS**

**CRIOPRESERVAÇÃO  
DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *Coffea arabica* POR VITRIFICAÇÃO**

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

Orientador:

Prof. Renato Paiva, Ph.D.

Coorientadores:

Dr. Diogo Pedrosa Corrêa da Silva

Dr<sup>a</sup>. Michele Valquíria dos Reis

**LAVRAS - MG**

**2016**

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

Freitas, Rodrigo Therezan de.

Criopreservação de embriões zigóticos de *Coffea arabica* por vitrificação : / Rodrigo Therezan de Freitas. – Lavras : UFLA, 2016.

49 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Renato Paiva.

Bibliografia.

1. Conservação ex situ. 2. PVS2. 3. Nitrogênio líquido. 4. Descongelamento. 5. Histologia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**RODRIGO THEREZAN DE FREITAS**

**CRIOPRESERVAÇÃO  
DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *Coffea arabica* POR  
VITRIFICAÇÃO**

**CRYOPRESERVATION  
OF ZYGOTIC EMBRYOS OF *Coffea arabica*  
BY VITRIFICATION**

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

APROVADA em 15 de Junho de 2016

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Carlota Nery UFSJ

Dr.<sup>a</sup> Milene Alves de Figueiredo Carvalho EMBRAPA

Orientador:

Prof. Renato Paiva, Ph.D.

**LAVRAS - MG**

**2016**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, pela oportunidade concedida para realização do mestrado.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Embrapa Café e ao Consórcio Pesquisa Café pela concessão de recursos para a execução do projeto.

Ao meu orientador Renato Paiva, por todas as oportunidades dadas a mim, por todos os conselhos e pela confiança no meu trabalho.

Aos membros da banca examinadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Fernanda Carlota Nery e Dr.<sup>a</sup>. Milene Alves de Figueiredo Carvalho pela disponibilidade de tempo e contribuição para o trabalho.

À Thaís pelo convívio no laboratório e por todos os momentos compartilhados e ajuda durante todos os experimentos.

À Chaiane por toda ajuda nos estudos de anatomia e a todos os outros integrantes do Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) por serem sempre gentis e solícitos.

Aos pós-doutorandos Diogo e Michele pela amizade e por todos os conselhos, apoio e ensinamentos.

À todos os amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (LCTP) e do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal pelo convívio, apoio, auxílio e amizade ao longo desses anos.

À minha família por acreditar no meu potencial e pelo apoio incondicional, permanecendo ao meu lado em todos os momentos e decisões.

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação.

Obrigado !

## RESUMO

Devido à importância econômica e social do cafeeiro para o Brasil, é necessário que sejam adotadas medidas para a conservação do seu recurso genético. Entretanto, em consequência da dificuldade de armazenamento de sementes de café de forma convencional, alternativas biotecnológicas tal como a criopreservação tem sido requerida. Neste contexto, objetivou-se desenvolver um protocolo para a criopreservação de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho (IAC 144) pela técnica de vitrificação. Primeiramente, avaliou-se a desinfestação das sementes e a excisão dos embriões zigóticos. Na desinfestação as sementes foram imersas em diferentes concentrações de formaldeído (0; 0,5; 1 e 1,5%) durante diferentes períodos de tempo (5, 15 e 30 min). Para a excisão dos embriões as sementes foram desinfestadas e imersas em solução de ácido bórico 0,5% durante diferentes períodos de tempo (1, 2 e 3 dias). Para o estudo de criopreservação, foram avaliados antes do congelamento diferentes tempos de imersão no *Plant vitrification solution 2* (PVS2) (0, 10, 25, 50, 100, e 250 min) em duas temperaturas (0°C e 25°C). Na sequência foi determinado o melhor tempo de descongelamento em banho-maria (1, 3, 5 ou diretamente em *Recovery solution* (RS)). Um estudo anatômico foi realizado em embriões zigóticos não criopreservados (controle), e criopreservado com ou sem o uso do crioprotetor PVS2. Posteriormente, foi realizada a aclimatização das plântulas oriundas de embriões criopreservados e não criopreservados. A completa desinfestação das sementes é obtida com 1 ou 1,5% de formaldeído por 30 min. A imersão das sementes por 2 ou 3 dias em solução de ácido bórico 0,5% torna as sementes mais maleáveis para a posterior excisão dos embriões, proporcionando 100% de germinação com plântulas normais. A criopreservação dos embriões zigóticos foi obtida com sucesso por meio da vitrificação. A imersão em solução crioprotetora por 100 min a temperatura de 0°C permite a criopreservação dos embriões promovendo 80% de germinação com 87% de plântulas normais. Para o descongelamento os embriões zigóticos congelados podem ser descongelados diretamente em RS, eliminando a necessidade de uso do banho-maria. Anatomicamente, observou-se que a solução de PVS2 reduziu o conteúdo interno de água das células verificando-se plasmólises celular, permitindo o congelamento e a posterior retomada de crescimento dos embriões após o descongelamento. Em relação à aclimatização trabalhos adicionais são necessários para melhorar a taxa de sobrevivência das plântulas oriundas de embriões congelados, uma vez que apenas 13% das plântulas sobreviveram após a aclimatização.

**Palavras-chave:** Conservação *ex situ*. PVS2. Nitrogênio líquido. Descongelamento. Histologia.

## ABSTRACT

Due to the economic and social importance of coffee to Brazil, it is necessary that measures must be taken for the conservation of their genetic resources. However, due the difficulty to coffee beans storage, biotechnological alternatives such as cryopreservation has been required. In this context, the objective was to develop a cryopreservation protocol by vitrification technique for zygotic embryos of *Coffea arabica* L. cv. Red Catuaí (IAC 144). First, we evaluated the seeds disinfection and zygotic embryos excision. In seeds disinfection, seeds were immersed in different formaldehyde concentrations (0, 0.5, 1 and 1.5%) for different periods of time (5, 15 and 30 min). For embryos excision the seeds were disinfected and further immersed in a boric acid solution 0.5% for different periods of time (1, 2 and 3 days). For the study of cryopreservation were evaluated before freezing different immersion times in Plant vitrification solution 2 (PVS2) (0, 10, 25, 50, 100, and 250 min) at two temperatures (0 °C and 25 °C). Following was determined the best thawing time in water bath (1, 3, 5 or directly in Recovery solution (RS)). A anatomical study was also conducted in zygotic embryos not cryopreserved (control), and in zygotic embryos frozen with or without the use of PVS2. It was subsequently set up the acclimatization of plantlets from cryopreserved embryos and not cryopreserved. The complete seeds disinfection was achieved with 1.5 or 1% formaldehyde for 30 min. Soaking seeds for 2 or 3 days makes more flexible seeds for the subsequent embryo excision, providing 100% germination with normal seedlings. Cryopreservation of zygotic embryos was successfully obtained by vitrification. Immersion in PVS2 solution for 100 min at 0 °C temperature allows cryopreservation of embryos promoting 80% germination with 87% of normal seedlings. For thawing the frozen zygotic embryos can be thawed directly in RS solution, thus eliminating the need to use water bath. Anatomically, it was observed that PVS2 solution decreases the internal water content of the cells observed by plasmolysis, allowing there freezing and subsequent growth resumption after thawing. Regarding acclimatization further work is needed to improve the survival rate of the seedlings derived from embryos frozen, since only 13% of seedlings survived after acclimatization.

**Keywords:** Ex situ conservation. PVS2. Liquid nitrogen. Thawing. Histology.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 <i>Coffea</i> spp.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Conservação de <i>Coffea</i> spp.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3 Criopreservação .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.1 Vitrificação .....</b>	<b>16</b>
<b>2.4 Análises pós descongelamento.....</b>	<b>17</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS: .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Desinfestação das sementes e excisão dos embriões zigóticos .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.1 Desinfestação de sementes .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.2 Embebição e excisão dos embriões zigóticos.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2 Criopreservação .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2.1 Determinação do tempo e temperatura do PVS2.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2.2 Determinação do tempo de descongelamento.....</b>	<b>23</b>
<b>3.3 Análises pós descongelamento.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3.1 Análise de viabilidade .....</b>	<b>24</b>
<b>3.3.2 Germinação <i>in vitro</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3.3 Análises histológicas.....</b>	<b>25</b>
<b>3.4 Aclimatização de plântulas criopreservadas .....</b>	<b>26</b>
<b>3.5 Análises estatísticas .....</b>	<b>26</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO:.....</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Desinfestação das sementes e excisão dos embriões zigóticos .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1.1 Desinfestação de sementes .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1.2 Embebição e excisão dos embriões zigóticos.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2 Criopreservação .....</b>	<b>31</b>
<b>4.2.1 Determinação do tempo e temperatura do PVS2.....</b>	<b>31</b>
<b>4.2.2 Determinação do tempo de descongelamento.....</b>	<b>37</b>
<b>4.2.3 Análises histológicas.....</b>	<b>38</b>



<b>4.2.4 Aclimatização .....</b>	<b>41</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, sendo este o quinto produto agrícola mais exportado. A área plantada com a cultura de café no país totaliza 2.248.565,8 hectares, e estima-se que sejam colhidas entre 37,74 a 39,87 milhões de sacas de café na próxima safra (CONAB, 2016).

Devido à importância econômica e social do cafeeiro para o Brasil, é necessário que sejam adotadas medidas para a conservação do seu recurso genético. Entretanto, as sementes do cafeeiro apresentam limitações com relação à sua conservação, uma vez que são classificadas como intermediárias, inviabilizando o armazenamento convencional via banco de sementes (ARAUJO et al., 2008; SIMOES-COSTA et al., 2009).

Em consequência da dificuldade de armazenamento de sementes de café, a principal forma de conservação da diversidade genética do cafeeiro tem sido realizada de forma *ex situ* por meio do plantio de mudas diretamente no campo. Entretanto, essa forma de conservação requer grandes áreas, um custo de manutenção elevado e muitos riscos que podem levar a perda da diversidade genética (VALDÉS, 2012, p. 29).

Dentre as técnicas de criopreservação a vitrificação é um método cujo material biológico é exposto a altas concentrações de soluções crioprotetoras. Essas soluções convertem o conteúdo interno de água a um estado amorfo permitindo assim que o material biológico seja rapidamente congelado a temperatura do nitrogênio líquido (SAKAI; ENGELMANN, 2007).

A criopreservação tem sido relatada como uma forma viável de conservação de *Coffea* spp. (SANTANA-BUZZY et al., 2007). Entretanto, a maioria desses trabalhos tem sido predominantemente realizados com sementes, porém, sabe-se que as sementes apresentam uma perda rápida de viabilidade e diferem quanto a sua tolerância a desidratação (DUSSERT et al., 1998). Diante

disto, é necessário para o sucesso da criopreservação que o lote de sementes utilizado esteja em alta qualidade inicial (DUSSERT; ENGELMANN, 2006).

Os embriões zigóticos podem ser uma alternativa como explante para a criopreservação via vitrificação, visto que os tecidos que formam os embriões são mais tenros que o endosperma das sementes, o que facilita a penetração das soluções crioprotetoras e a desidratação. Além disso, os embriões apresentam variabilidade genética necessária para os programas de melhoramento (SANTANA-BUZZY et al., 2007), e uma germinação mais uniforme e rápida em relação as sementes (BOJÓRQUEZ-QUINTAL et al., 2011).

Portanto, estudos que busquem alternativas para armazenamento de diferentes explantes tal como o embrião zigótico são considerados de extrema importância. Neste contexto, objetivou-se desenvolver um protocolo para a criopreservação de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho (IAC 144) por meio da técnica de vitrificação.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Coffea* spp.

O cafeeiro é uma espécie lenhosa que varia de pequeno arbusto a árvores robustas (DUSSERT, et al., 2002), podendo chegar até 4 metros de altura, apresentando uma copa formada por um conjunto de ramos divididos em ortotrópicos e plagiotrópicos (BORÉM, 2008, p. 631).

O fruto do cafeeiro é classificado como uma drupa, indeiscente, com o pericarpo diferenciado em exocarpo, mesocarpo e endocarpo, que envolve um ovário bilocular onde normalmente estão localizadas duas sementes. As sementes são constituídas por um endosperma verdadeiro dentro do qual se insere o embrião com dois pequenos cotilédones e eixo hipocotiledonar (BORÉM, 2008, p. 631).

Originário do continente africano o cafeeiro é uma espécie pertencente ao gênero *Coffea* L. da família Rubiaceae, o qual apresenta cerca de 100 espécies identificadas, das quais *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre são as espécies de maior valor comercial (DAVIS et al., 2006). Diferentemente dessas espécies que são amplamente utilizadas, as demais espécies não possuem um alto valor comercial, porém, devido a variabilidade genética são bastante utilizadas em programas de melhoramento genético (VOSSSEN; BERTRAND; CHARRIER, 2015).

O café arábica (*Coffea arabica* L.) é a espécie mais importante do gênero, e representa mais de 76% da produção total de café do Brasil (CONAB, 2016). Dentre as espécies do gênero *Coffea*, *C. arabica* é a única tetraplóide, ou seja, possui quatro conjuntos do número básico de cromossomos do gênero ( $n=11$ ), totalizando 44 cromossomos, sendo as demais diploides (LASHERMES et al., 1999).

Da espécie *Coffea arabica* a variedade Catuaí é uma das mais difundidas no Brasil. Esta variedade é resultante do cruzamento artificial de cafeeiros selecionados de ‘Caturra Amarelo’ e ‘Mundo Novo’. A planta é bastante rústica e produtiva, geralmente cultivada a livre crescimento e tem sido amplamente utilizada devido a sua qualidade de bebida (SOUZA et al., 2003).

## **2.2 Conservação de *Coffea* spp.**

O cafeeiro foi introduzido no Brasil no século XVIII e desde então é parte importante da economia do país. Atualmente o café é considerado uma das commodities mais importantes do comércio agrícola internacional (FAO, 2015).

O Brasil tem o café como um dos principais produtos agrícolas e é considerado mundialmente como o principal produtor e exportador dessa *commodity*, sendo que o país está entre os três países que juntos representam mais de 50% da produção mundial (FAO, 2015).

Contudo, a sustentabilidade da cafeicultura depende principalmente da disponibilidade de diversidade genética. Os recursos genéticos disponíveis são considerados a fonte principal para qualquer programa de melhoramento (NASS et al., 2008).

A diversidade genética é necessária para os programas de melhoramento buscarem genótipos mais adaptados, e por meio da manipulação de genes fornecer às plantas resistência à pragas e doenças, tolerância a estresses ambientais, para melhorar a qualidade da bebida e aumentar a produtividade (DULLOO et al., 2009; NASS et al., 2008).

As sementes por serem a unidade de propagação natural para a maioria das espécies é também a forma mais comum de conservação *ex situ*. Porém, a baixa longevidade das sementes do café é um fator limitante para a conservação

de sua variabilidade em longo prazo (SANTANA-BUZZY et al., 2007; SANTOS, 2000, p. 70).

Essa baixa longevidade tem sido atribuída à sensibilidade das sementes a desidratação, por isso as sementes de café são classificadas como intermediárias, que mesmo nas melhores condições de armazenamento não permanecem viáveis por muito tempo (NAIDU; SREENATH, 1999). Por esse motivo a principal forma de conservação das espécies de café é realizada pelo plantio de mudas no campo (SANTANA-BUZZY et al., 2007).

Devido à importância da conservação da variabilidade genética existente entre as espécies do cafeeiro, desde 1972 uma grande coleção de germoplasma de café arábica foi iniciada de forma *ex situ* na Etiópia (VOSSEN; BERTRAND; CHARRIER, 2015).

O Brasil também possui uma expressiva coleção de *Coffea* spp. em condição de campo, mantido por diversos institutos conforme descrito por Dulloo et al. (2009). No entanto este tipo de conservação, assim como a conservação *in situ* apresenta alguns inconvenientes que limitam a sua eficiência e segurança. As plantas estão expostas a pragas e doenças, fenômenos naturais, erros humanos, além do alto custo de manutenção (VALDÉS, 2012, p. 29). Por isso, alternativas biotecnológicas tal como a conservação *in vitro* tem sido requerida para a conservação de germoplasma do cafeeiro (SANTANA-BUZZY et al., 2007).

Na conservação *in vitro* por meio da criopreservação o material biológico pode ser armazenado em espaço reduzido de forma segura por um longo período de tempo, protegido de contaminação, e com requerimento mínimo de subcultivos (ENGELMANN, 2010, p. 5). Sendo esta considerada a principal técnica para conservação em longo prazo de germoplasma (SAN JOSÉ et al., 2015; SANTANA-BUZZY et al., 2007).

### 2.3 Criopreservação

Na criopreservação o material genético pode ser conservado devido á ultra-baixa temperatura (-196°C) do nitrogênio líquido no qual os explantes são mantidos. Nessa condição o metabolismo e a degradação celular permanecem praticamente paralisados, podendo assim o material ser armazenado teoricamente por tempo indeterminado (ENGELMANN, 2004, p. 427).

Nos últimos anos alguns protocolos de criopreservação para o cafeeiro foram desenvolvidos. Estes protocolos diferem quanto as técnicas de criopreservação, o tipo de explante e as espécies ou cultivares utilizados conforme listados por Santana-Buzzy et al., (2007).

No caso do cafeeiro as sementes tem sido a principal escolha como explante para a conservação em longo prazo via criopreservação (DUSSERT, et al., 2002). Porém, sabe-se que dentro do gênero *Coffea* são encontrados espécies com diferentes graus de tolerância a dessecação e que devido a perda da viabilidade rápida da semente é necessário que o lote utilizado para a criopreservação possua alta viabilidade ( DUSSERT et al., 1997; DUSSERT; ENGELMANN, 2006).

Na criopreservação a maior dificuldade durante o congelamento é prevenir a formação de grandes cristais de gelo, que podem causar a destruição das membranas causando danos irreversíveis (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005). Para que não ocorra a formação de gelo é necessário que o explante apresente um baixo conteúdo de água. Assim, a desidratação do explante antes da criopreservação é necessária (ENGELMANN, 2010, p. 5). Entretanto, a redução do conteúdo de água deve ser de forma controlada, uma vez que a água é requerida para subsequente reestabelecimento dos processos metabólicos e uma desidratação extrema pode ocasionar a morte celular (GONZALEZ-ARNAO et al., 2007).

### 2.3.1 Vitrificação

A vitrificação é uma das técnicas mais comumente usada para a criopreservação. A vitrificação é um processo pelo qual a solução aquosa intracelular é convertida a um estado amorfo, por meio da transição direta da água do estado líquido para o estado vítreo, evitando-se assim a formação de grandes cristais de gelo (SAKAI; ENGELMANN, 2007).

Na vitrificação os explantes devem ser suficientemente desidratados. No entanto, o tempo necessário de exposição para que ocorra a completa difusão e conseqüentemente a vitrificação varia principalmente com a espécie, com as dimensões físicas, permeabilidade do tecido e a temperatura utilizada do crioprotetor (NADARAJAN; PRITCHARD, 2014)

A entrada dos componentes da solução de vitrificação no citoplasma é totalmente necessária para a sua função crioprotetora (VOLK; WALTERS, 2006). Porém, uma vez que as soluções crioprotetoras podem apresentar toxicidade química ou causar estresse osmótico, o tempo de exposição a estas soluções deve ser controlado (SAKAI; ENGELMANN, 2007).

Segundo Tao e Li (1986) os crioprotetores são classificados baseado em sua permeabilidade na membrana plasmática em três categorias. Os penetrantes à parede celular e à membrana plasmática (glicerol, etilenoglicol e dimetilsulfóxido (DMSO)); penetrantes a parede celular (aminoácidos como prolina e oligossacarídeos como a sacarose e manitol) e os não penetrantes ( macromoléculas de alto peso molecular, tais como as proteínas solúveis, lipídeos e polissacarídeos).

*Plant vitrification solution* (PVS2) é a solução crioprotetora mais amplamente utilizada em trabalhos de criopreservação. A solução é constituída por crioprotetores penetrantes e não-penetrantes todos diluídos em meio de cultivo MS desenvolvido por Murashige e Skoog (1962). O PVS2 possui 30%



de glicerol (p/v), 15% de etilenoglicol (p/v), 15% de DMSO (p/v) e 0,4 M de sacarose (SAKAI; ENGELMANN, 2007).

O estado de vitrificação é instável, principalmente durante o reaquecimento dos explantes. Por isso, o descongelamento também é uma etapa crítica durante a criopreservação. Durante o descongelamento pode ser formado cristais de gelo tanto pelo congelamento da água liberada pela desvitrificação ou devido ao aumento de pequenos cristais de gelos formados durante o congelamento. Esses pequenos cristais não afetam a estrutura celular durante o congelamento, porém, com o aumento da temperatura, estes podem se expandir e causar o rompimento das membranas e conseqüentemente a morte celular (SANTOS, 2000, p. 70).

Normalmente os explantes congelados em NL são descongelados de forma rápida principalmente por imersão em banho-maria na temperatura de 22°C a 45°C em diferentes tempos, tal como descrito por Lambardi, Fabbri e Caccavale, (2000). No entanto, o descongelamento diretamente em *Recovery Solution* (RS) [1.2 M sacarose dissolvida em MS líquido] (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990) tem sido mais amplamente utilizado quando os explantes utilizados são meristemas, sendo poucos os relatos de descongelamento de embriões zigóticos em RS (SILVA et al, 2014).

## **2.4 Análises pós descongelamento**

Durante as etapas da criopreservação danos celulares podem ocorrer impedindo a sobrevivência ou a completa regeneração dos explantes em plantas normais (WEN et al., 2012).

Danos celulares podem ser observados quando os explantes são congelados com o seu conteúdo de água inicial ou quando não desidratados suficientemente. Segundo Wen et al., (2012) rupturas nas paredes e membrana

plasmática, com extravasamento de material citoplasmático e ruptura do envelope nuclear são danos comumente observados resultantes da formação de cristais de gelo durante a criopreservação.

Plasmólises também tem sido observadas confirmando a ocorrência de perda de água durante as etapas da criopreservação. Plasmólise é um processo osmótico, no qual a perda de água pela célula vegetal ocasiona o afastamento da membrana plasmática da parede celular (YI et al., 2012).

Na criopreservação via vitrificação as plasmólises formadas são em consequência do efluxo de água pela ação osmótica da solução crioprotetora utilizada (BARRACO et al, 2013; YI et al., 2012).

Após o descongelamento, as células vivas anteriormente plasmolisadas retomam em pouco tempo a sua turgidez e atividade promovendo a retomada de crescimento do explante. Assim, este processo pode ser utilizado para indicar a sobrevivência da célula, pois, tem sido observado principalmente nos tratamentos que tiveram as maiores taxas de regeneração (BARRACO et al, 2013).

Além das análises anatômicas, dentre os testes para avaliação da integridade celular, o tetrazólio é um teste rápido e eficaz utilizado rotineiramente em laboratórios para análise de viabilidade de lotes de sementes. Atualmente o teste de tetrazólio também tem sido utilizado na criopreservação para antecipar resultados e correlacionar com regeneração após o descongelamento (LIU et al., 2015).

O teste baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases, onde o sal 2,3,5 trifênil cloreto de tetrazólio é reduzido quando reage com íons liberados durante a respiração. A liberação iônica resulta na formação de um composto vermelho, não difusível, conhecido como trifênilformazan, indicando assim atividade respiratória nas mitocôndrias e, conseqüentemente que o tecido é viável (DELOUCHE et al., 1976).

Após a regeneração do explante criopreservado a aclimatização é uma etapa crucial para a verificação do sucesso da técnica, pois o objetivo da criopreservação além da conservação do material vegetal, é a possibilidade de restabelecimento deste material no campo. No entanto, durante o transplante as plantas estão susceptíveis a diversas fontes de estresse (HUYLENBROECK; PIQUERAS; DEBERGH, 2000)

No cultivo *in vitro* a intensidade luminosa é baixa e a umidade relativa é alta, nessa condição a planta possui disponível uma fonte de carbono e nutrientes que fornecem energia suficiente para o seu desenvolvimento. Por essas razões, as plantas não controlam bem a perda de água e tem um pobre desenvolvimento do aparato fotossintético, o que as tornam vulneráveis a transferência direta a pleno sol (HAZARIKA, 2006, p. 105).

Para minimizar esses efeitos, a aclimatização é utilizada anterior a transferência ao campo. Este processo é usualmente realizado sob condições controladas de temperatura e umidade, normalmente em casa de vegetação. Durante esta etapa mudanças fisiológicas e anatômicas ocorrem permitindo que as plantas se adaptem e possam ser estabelecidas no campo a pleno sol (CHAARI-RKHIS et al., 2015; RODRIGUES et al., 2015).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS:**

Sementes de *Coffea arabica* L. cv. Catuai Vermelho (IAC 144) foram obtidas beneficiadas a partir de lavouras da Fazenda experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) localizada na cidade de Três Pontas - MG.

#### **3.1 DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES E EXCISÃO DOS EMBRIÕES ZIGÓTICOS**

Os experimentos de desinfestação e embebição das sementes foram realizados para a otimização da metodologia descrita por Dela Cruz et al (1992) apud (ALEMÁN, et al, 2014, p. 96).

##### **3.1.1 Desinfestação de sementes**

Após a retirada manual do endocarpo, as sementes foram imersas em diferentes concentrações de formaldeído (0; 0,5; 1 e 1,5%) durante diferentes períodos de tempo (5, 15 e 30 min) sob agitação de 150 rpm a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Foram utilizados 2 mL da solução (formaldeído em diferentes concentrações) por semente. Após esse período, em câmara de fluxo, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada, e inoculadas em meio MS, suplementado com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, solidificado com  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  de Phytigel<sup>®</sup> e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, realizada a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos. As sementes foram mantidas em fotoperíodo de 16 horas, temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e com irradiância de fótons de  $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Após 30 dias foram avaliados a porcentagem de sementes desinfestadas (%). Foram utilizados 15 sementes por tratamento, sendo considerado 5 repetições com 3 sementes por parcela em um esquema fatorial 4x3 sendo 4 concentrações de formaldeído e 3 tempos de imersão na solução.

### **3.1.2 Embebição e excisão dos embriões zigóticos**

Para a excisão dos embriões, as sementes foram imersas em solução de formaldeído para a desinfestadas e na sequência foram imersas em ácido bórico 0,5% durante diferentes períodos de tempo (1, 2 e 3 dias) sob agitação de 150 rpm a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Após esse período, em câmara de fluxo, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada, para posterior remoção dos embriões zigóticos. Após a excisão os embriões foram inoculados em meio MS, suplementado com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, solidificado com  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  de Phytigel<sup>®</sup> e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, realizada a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos. Após 30 dias da inoculação, foram avaliados a porcentagem de germinação (%) e porcentagem de formação de plântulas normais (%).

Adicionalmente, foi realizado a determinação do grau de umidade das sementes nos diferentes períodos de tempo de imersão em ácido bórico (0, 1, 2 e 3 dias) por meio do método da estufa a  $105^{\circ}\text{C}$ , durante 24 h, e os resultados foram expressos em porcentagem, em base úmida de acordo com as Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009).

## **3.2 CRIOPRESERVAÇÃO**

### **3.2.1 Determinação do tempo e temperatura do PVS2**

A criopreservação foi realizada por meio da técnica de vitrificação com adaptações do protocolo descrito por Sakai e Engelmann (2007) (FIGURA 1).

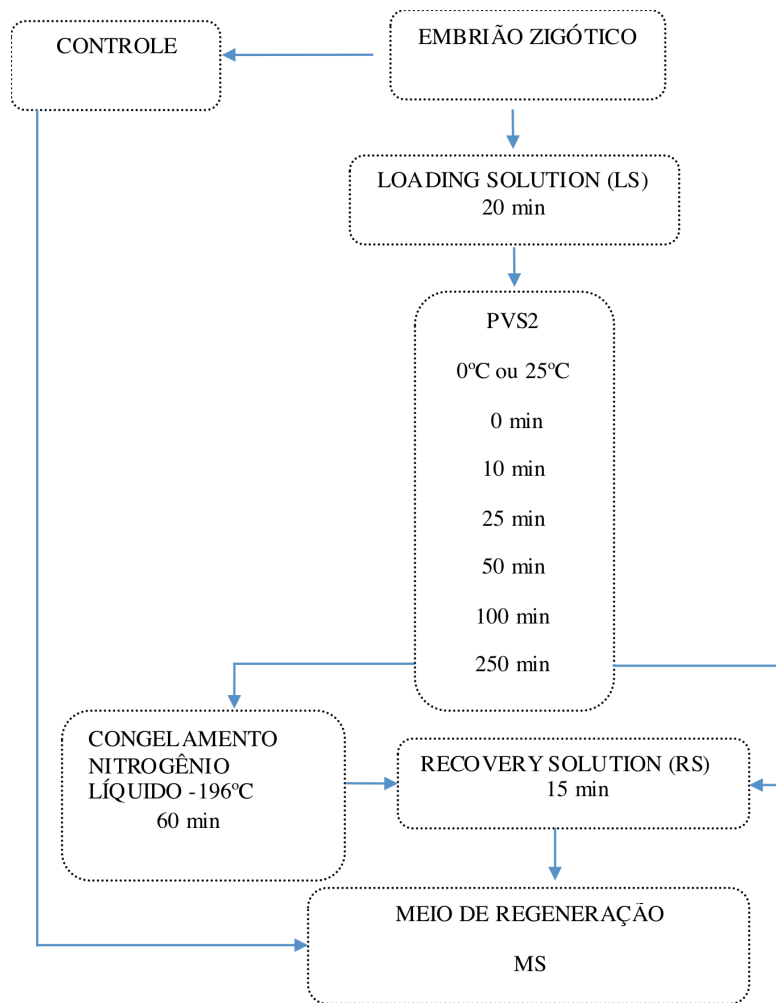


Figura 1 - Diagrama dos experimentos para a determinação do tempo e temperatura da solução vitrificante PVS2.

Os embriões extraídos foram expostos a *Loading Solution* (LS) [2M de glicerol + 0.4 M de sacarose em MS líquido] (MATSUMOTO; SAKAI; YAMADA, 1994) por 20 minutos em temperatura ambiente, sendo posteriormente imersos em solução de *Plant vitrification solution 2* (PVS2)

[30% de glicerol + 15% etileno glicol + 15% DMSO + 0,4 M de sacarose em MS líquido] (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990) a 0°C ou em temperatura ambiente aproximadamente 25°C ± 2°C em diferentes intervalos de tempo: 0, 10, 25, 50, 100, e 250 minutos em um esquema fatorial com 6 (tempos de imersão) x 2 (temperatura do PVS2). Após cada intervalo de tempo os embriões de cada tratamento foram colocados em criotubos de 2 mL contendo 0,5 mL de PVS2 e imersos em nitrogênio líquido (NL) (-196° C) por 60 min. Após o período de congelamento, os embriões foram descongelados em *Recovery Solution* (RS) [1.2 M sacarose dissolvida em MS líquido] (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990) por 15 minutos em temperatura ambiente, e os embriões não imersos em NL (controle) foram imersos diretamente em RS. Após o período de imersão em RS todos os tratamentos e seus respectivos controles foram inoculados em meio de regeneração MS, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com 2,5 g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup> e com pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, realizada a 121°C durante 20 minutos.

Para prevenir possíveis oxidações os embriões zigóticos permaneceram em sala de crescimento no escuro por 3 dias em temperatura de 25 ± 2°C. Após esse período, estes foram transferidos para o fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2°C e com irradiância de fótons de 36 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. As análises de viabilidade, germinação, formação de plântulas normais e histológicas foram realizadas conforme descrito no item 3.3.

### **3.2.2 Determinação do tempo de descongelamento**

Para a determinação do tempo de descongelamento os embriões foram criopreservados utilizando o melhor tempo e temperatura de PVS2 do experimento anterior e foram descongelados em banho-maria à 40°C ± 2°C por diferentes tempos (0, 1, 3 e 5 minutos). O tempo zero (controle) foi descongelado em RS por 15 minutos em temperatura ambiente. Os demais

tratamentos foram descongelados primeiramente em banho-maria e posteriormente imersos por 15 min em RS.

Após o descongelamento, os embriões foram mantidos na sala de crescimento no escuro por 3 dias, e na sequência, foram transferidos para fotoperíodo de 16 horas, temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e com irradiância de fótons de  $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . As análises de germinação e formação de plântulas normais foram realizadas conforme descrito no item 3.3.2.

### **3.3 ANÁLISES PÓS DESCONGELAMENTO**

#### **3.3.1 Análise de Viabilidade**

Após o descongelamento, 15 embriões de cada tratamento foram lavados em água destilada e submersos em solução a 0,5% de 2,3,5 Trifenil Cloreto de Tetrazólio, permanecendo por 2 horas na ausência de luz em incubadora do tipo BOD a  $30^\circ\text{C}$ , conforme metodologia descrita por Clemente, Carvalho e Guimarães (2012).

Os embriões foram na sequência lavados em água corrente, observados individualmente e classificados em viáveis ou inviáveis de acordo com a coloração visível observada, utilizando os critérios descritos por Clemente, Carvalho e Guimarães (2012).

Os resultados foram expressos em porcentagem de embriões viáveis (%) após o descongelamento.

#### **3.3.2 Germinação *in vitro***

Após 30 dias do descongelamento, foi avaliada a porcentagem de germinação e a porcentagem de plântulas normais. Foi considerado germinado quando o embrião apresentou um visível crescimento da parte aérea e do eixo



hipocótilo-radícula, e considerado plântula normal quando tanto a parte aérea e cotilédones, quanto o eixo hipocótilo-radícula não apresentavam danos durante o crescimento, apresentando similaridade ao controle (FIGURA 2).

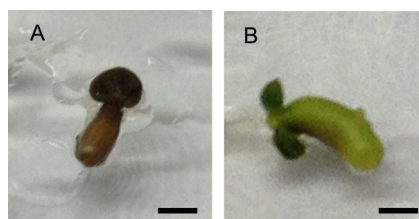


Figura 2 - Aspecto visual de embriões considerados como não germinados após 30 dias de cultivo barra: 5mm (A). Aspecto visual de embriões considerados germinados com formação de plântulas normais após 30 dias de cultivo barra: 5mm (B).

### 3.3.3 Análises histológicas

Para as análises histológicas, os embriões congelados sem PVS2 (tempo zero), congelados utilizando o melhor tratamento de tempo e temperatura de PVS2 e embriões apenas excisados (controle) foram coletados e fixados em álcool 70%, para posterior desidratação em gradiente de etanol.

Os embriões fixados foram progressivamente desidratados por meio de um gradiente de etanol (70, 80, 90 e 100% v/v) com mudança a cada 1 hora.

Para a desidratação os embriões foram embebidos em solução de pré-infiltração contendo resina e álcool 100% na proporção 1:1, por 24 horas em temperatura ambiente.

Após a pré-infiltração foi adicionado a resina ativada por 48 horas em temperatura ambiente, para na sequência ser realizado o emblocamento com a historesina ativada mais catalisador (Leica Historesin Embedding Kit) por 2 horas. Na sequência os embriões emblocados foram mantidos a 37°C durante 3 dias.

As seções longitudinais com espessura de 5  $\mu$ m foram realizadas por meio de um micrótomo rotativo e coradas duplamente com o reagente de ácido

periódico de Schiff (PAS), que permite a caracterização de compostos polissacarídeos (FISHER, 1968, p. 92) e azul de toluidina na concentração de 0,1%, que permite corar tecidos com alto conteúdo de DNA e RNA (SRIDHARAN; SHANKAR, 2012). Posteriormente os cortes foram montados em lâminas histológicas semipermanentes com água glicerinada e visualizados em microscópio óptico Leica®.

### **3.4 ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS CRIOPRESERVADAS**

Plântulas oriundas do melhor tratamento criopreservado e o controle (não criopreservado) mantidas em meio MS após 60 dias foram transferidos para tubetes de polietileno e mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 12 h de luz, irradiância de fótons  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Os tubetes foram preenchidos com substrato comercial (Tropstrato hp®) e permaneceram cobertos com envoltório plástico nos primeiros 15 dias. Após 60 dias de aclimatização foram avaliados a porcentagem de plantas sobreviventes (%), o comprimento da parte aérea (cm), número de folhas e raízes formadas e o comprimento da raiz principal (cm).

### **3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Todos os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 5 repetições com 3 explantes por parcela. Os resultados expressos em termos de porcentagem foram calculados por meio da fórmula  $[G(\%) = (\sum n_i) \cdot N^{-1} \cdot 100]$ , em que:  $n_i$  = número de embriões germinados,  $N$  = número de embriões colocados para germinar], que foram transformados segundo arco seno  $(x/100)^{0,5}$ .

Todos os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2014, p. 109) e as médias foram analisadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES E EXCISÃO DOS EMBRIÕES ZIGÓTICOS

#### 4.1.1 Desinfestação de sementes

Com exceção dos tratamentos sem formaldeído (controle), todos os demais tempos e concentrações testadas apresentaram uma diminuição da contaminação fúngica das sementes (TABELA 1).

Tabela 1 - Porcentagem de desinfestação de sementes de café imersas em solução com diferentes concentrações de formaldeído por diferentes tempos.

Concentração (%)	Tempo (min)		
	5	15	30
0	0,0cA	0,0cA	0,0cA
0,5	46,0bB	53,0bB	80,0bA
1	73,0aB	80,0aB	100,0aA
1,5	80,0aA	86,0aA	100,0aA

\* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A desinfestação de sementes apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, atingindo 100% de desinfestação quando imersas sob agitação com 1% ou 1,5% de formaldeído por 30 min, porém, estes não diferiram estatisticamente de 1,5% por 5 ou 15 min de imersão.

Uma vez que antes da inoculação *in vitro* a descontaminação das sementes é obrigatória, é necessário que se tenha 100% de descontaminação, por isso, a solução de desinfestação deve ser capaz de matar ou remover totalmente os microrganismos da superfície das sementes de forma eficiente (ALVAREZ-PARDO; FERREIRA; NUNES, 2006). Portanto, visto que a completa desinfestação das sementes, ou seja 100% de descontaminação foi obtida com o uso de 1% ou 1,5% de formaldeído por 30 min, é indicado que a

descontaminação das sementes de café seja realizada nessas concentrações e tempo para uma total descontaminação.

#### 4.1.2 Embebição e excisão dos embriões zigóticos

Inicialmente as sementes apresentavam 10% de grau de umidade e tiveram aumento no teor de água após a desinfestação e imersão em ácido bórico por diferentes tempos, até atingirem 55% de grau de umidade após 3 dias de embebição (FIGURA 3).

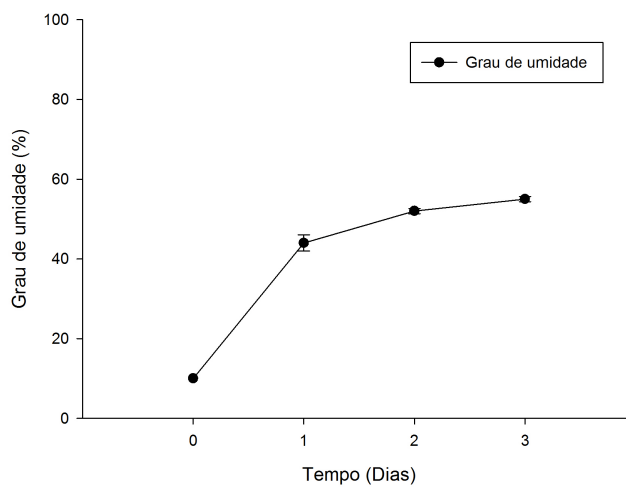


Figura 3 - Grau de umidade de sementes de café imersas em solução de ácido bórico 0,5% por diferentes tempos.

A imersão das sementes na solução de embebição facilitou a remoção dos embriões do endosperma. Os embriões excisados de sementes que anteriormente haviam sido imersas por 2 e 3 dias apresentaram 100% de germinação e formação de plântulas normais, enquanto que os embriões excisados de sementes imersas por apenas 1 dia apresentaram apenas 47% de germinação e 33% de formação de plântulas normais (FIGURA 4).

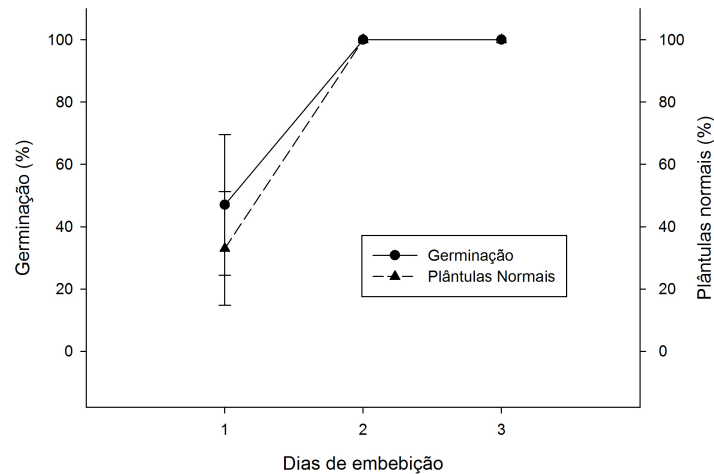


Figura 4 - Porcentagem de germinação e formação de plântulas normais obtidas de embriões zigóticos excisados de sementes submetidas a diferentes tempos de embebição (1, 2 e 3 dias) em ácido bórico aos 30 dias de cultivo. As barras representam o erro padrão da média de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O aumento na porcentagem de germinação e na formação de plântulas normais nos maiores tempos de imersão (2 e 3 dias) foi devido a maior facilidade de remoção do embrião. As sementes embebidas se tornaram mais maleáveis, diminuindo assim a necessidade de aplicação de força para a excisão do embrião, com menor risco de danos durante a excisão.

Por outro lado, as sementes anteriormente mantidas apenas por 1 dia em solução são menos maleáveis, e assim como nas sementes não embebidas a remoção do embrião torna-se mais difícil. A aplicação de força para a remoção do embrião nessas condições pode causar danos ao embrião inibindo a sua germinação ou diminuindo o número de plântulas normais.

Possivelmente, o ácido bórico utilizado na solução de embebição, além da sua capacidade fungicida que juntamente com o formaldeído pode ter contribuído para a não contaminação dos embriões, pode também ter aumentado

a capacidade das sementes em absorver água (KARTAL; HWANG; IMAMURA, 2007; LESAR; HUMAR, 2009).

## **4.2 CRIOPRESERVAÇÃO**

### **4.2.1 Determinação do tempo e temperatura do PVS2**

Assim como o controle, ou seja, aqueles embriões que foram apenas excisados e inoculados em meio de cultivo, os embriões que foram tratados com PVS2 e não congelados apresentaram 100% de germinação, com 100% de formação de plântulas normais independente do tempo de exposição destes ao PVS2 quando em temperatura de 0°C (FIGURA 5A, 5B e 5C).

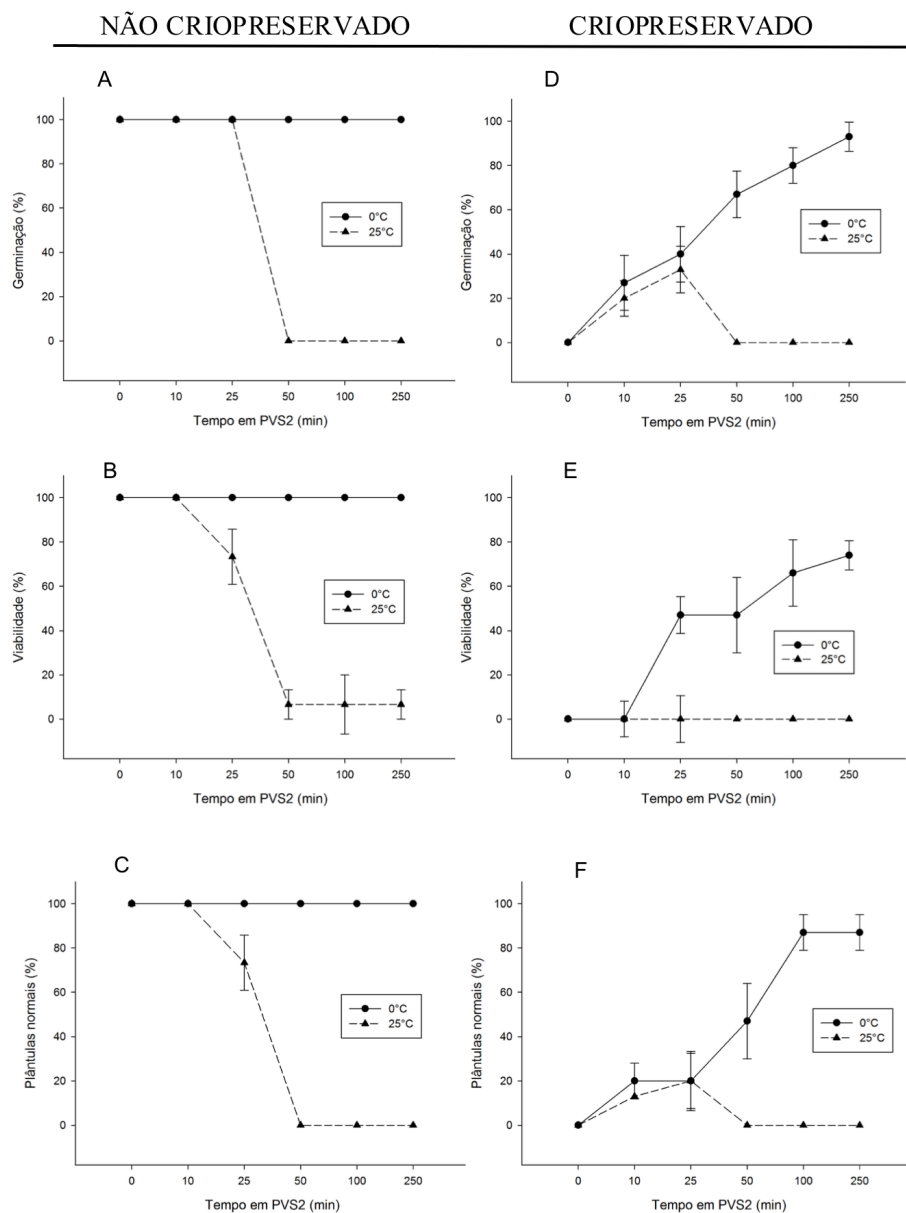


Figura 5 - Porcentagem de viabilidade, germinação e porcentagem de plântulas normais obtidas de embriões zigóticos submetidas a diferentes tempos (0, 10, 25, 50, 100 e 250 min) e temperatura (0 e 25°C) de imersão em solução crioprotetora PVS2 após o congelamento ou não em NL aos 30 dias de cultivo. As barras representam o erro padrão da média de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.



Por outro lado, quando utilizado o PVS2 a 25°C a germinação e a formação de plântulas normais ocorreu apenas nos tempos iniciais de exposição à solução (10 min e 25 min) (FIGURA 5A, 5B e 5C). Nos tratamentos que foram avaliados períodos superiores a 25 min não ocorreu germinação dos embriões, apresentando uma reduzida viabilidade (FIGURA 5B).

A baixa viabilidade e não germinação dos embriões tratados com PVS2 em tempo de imersão superiores a 25 min a 25°C evidencia que o PVS2 nessas condições possivelmente se tornou tóxico aos embriões. Resultados semelhantes foram obtidos na vitrificação de gemas apicais de *Populus alba* L. (LAMBARDI; FABBRI; CACCAVALE, 2000). As gemas que foram tratadas com a solução de PVS2 acima de 20 min a 25°C ou acima de 60 min a 0°C apresentaram sintomas claros de danos causados por toxicidade ou por estresse osmótico, tais como o branqueamento ou a não retomada de crescimento.

O PVS2 pode apresentar uma alta toxicidade química devido a presença dos crioprotetores permeáveis DMSO e etileno glicol em sua constituição. Essa toxicidade pode ser intensificada quando aplicado em temperatura ambiente. Em condição de maior temperatura a solução vitrificante PVS2 possui uma maior capacidade de penetração nos tecidos (YI et al., 2012). De forma contrária, em uma temperatura inferior, a mobilidade da solução é reduzida, diminuindo a velocidade de penetração da solução pela membrana plasmática, evitando o efeito tóxico e a desidratação excessiva do explante (KIM et al., 2009).

Apesar dos efeitos tóxicos e osmóticos potenciais que os constituintes do PVS2 podem apresentar, a solução de PVS2 é necessária para que ocorra a vitrificação e posterior criopreservação dos explantes utilizados. Prova disso, é que os embriões que não foram imersos em PVS2 (tempo 0), quando submetidos ao congelamento em NL e descongelados, não germinaram e não apresentaram viabilidade após o teste de tetrazólio (FIGURA 5D, 5E e 5F), se tornando

oxidados durante o cultivo *in vitro* (FIGURA 6A), diferentemente dos embriões congelados após o tratamento com PVS2 (FIGURA 6B).

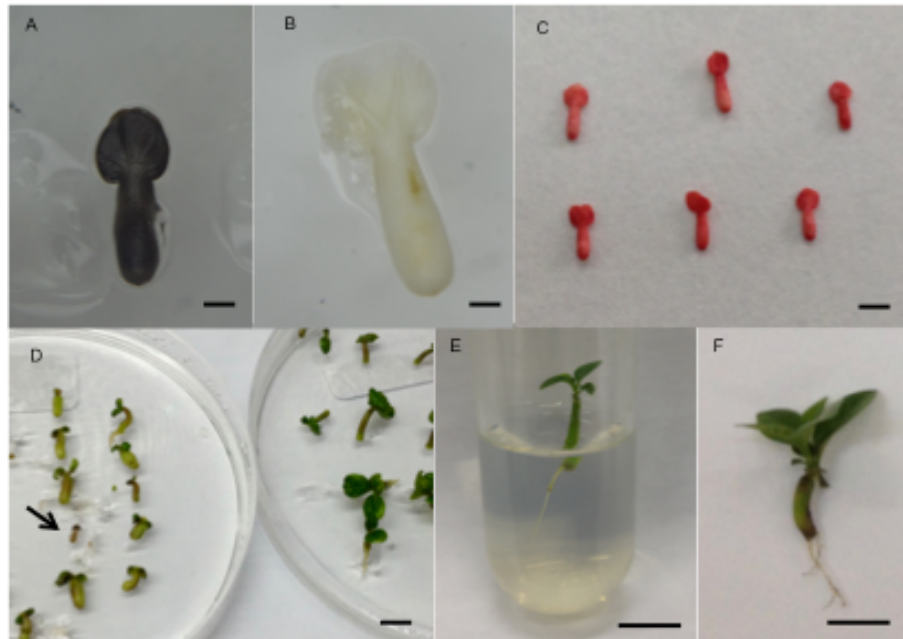


Figura 6 - Embrião zigótico congelado sem tratamento de PVS2 durante cultivo *in vitro*, barra: 1mm. (A). Embrião zigótico congelado tratado com 100 min de PVS2 a 0°C, barra: 0,7mm (B). Aspecto visual de embriões viáveis corados pela solução de tetrazólio, barra: 3mm (C). Aspecto visual de embriões criopreservados (esquerda) e não criopreservados (direita) após 30 dias de cultivo (a seta indica embrião criopreservado não sobrevivente), barra: 0,5cm (D). Plântula cultivada *in vitro* oriunda de embrião criopreservado após 60 dias, barra: 1cm (E). Plântula oriunda de embrião criopreservado ao final de 60 dias da aclimatização, barra: 1cm (F).

A não sobrevivência desses embriões não imersos em PVS2 (tempo zero) era esperada, uma vez que nestes embriões o conteúdo de água era muito alto para prevenir a formação de grandes cristais de gelo.

Segundo Tao e Li (1986) durante o congelamento, além da ruptura das membranas ocasionado pela própria formação dos grandes cristais de gelo, a medida que a temperatura decresce, a formação extracelular de cristais de gelo impulsiona o efluxo de água do protoplasma diminuindo a adesão da parede

celular com a membrana plasmática e consequentemente causando a deformação da célula.

Diferentemente dos embriões não tratados com PVS2 (tempo 0) que foram congelados e não germinaram, os embriões imersos em solução de PVS2 a 0°C apresentaram uma taxa de sobrevivência ao congelamento entre 27% a 93%, apresentando viabilidade (FIGURA 5E e 6C), germinando e formando plântulas normais após o descongelamento. Foi observado que com o aumento do tempo de imersão em PVS2 a 0°C houve um aumento da viabilidade, da germinação e da formação de plântulas normais após o congelamento (FIGURA 5D, 5E e 5F).

Segundo Sakai e Engelmann (2007), o sucesso da criopreservação via vitrificação está na otimização do tempo e temperatura de exposição ao PVS2 para a rápida vitrificação do explante durante o congelamento em NL.

O tratamento com PVS2 promove a desidratação do explante devido a transferência de massa de água, pois a massa de água perdida da célula é correspondente a massa de entrada da solução crioprotetora. A solução de PVS2 também promove a crioproteção, reduzindo a mobilidade das moléculas de água, permitindo que ocorra a vitrificação durante o rápido congelamento em NL (VOLK; WALTERS, 2006).

Os embriões congelados que foram imersos em PVS2 a 25°C como já esperado nos tempos superiores a 25 min não sobreviveram ao congelamento, visto que o PVS2 mesmo em condições de não congelamento já havia sido tóxico aos embriões, como descrito anteriormente. Já os tempos inferiores a 50 min (10 e 25 min) a 25°C apresentaram embriões sobreviventes, porém com apenas 20% e 33% de germinação e com 13% e 27% de formação de plântulas normais respectivamente, com quase nenhuma viabilidade pelo teste de tetrazólio (FIGURA 5D, 5E e 5F).

A maior porcentagem de germinação (93%) assim como de viabilidade (73%) ocorreu com o maior tempo testado (250 min) de imersão em PVS2 a 0°C, porém, este não diferiu estatisticamente de 50 e 100 min nas mesmas condições (FIGURA 5D e 5E). Já o tratamento dos embriões por 100 min e 250 min nessa solução proporcionou 87% de formação de plântulas normais em ambos os tempos (FIGURA 6F). Com isso, não havendo diferença estatística entre 100 min e 250 min em todos os parâmetros testados, e sendo estes os tempos de imersão em PVS2 que apresentaram os melhores resultados, utilizou-se 100 min de PVS2 para os experimentos subsequentes.

Em relação a viabilidade dos embriões pelo teste de tetrazólio observou-se que apesar da variação dentro dos tratamentos, pode-se obter um bom indicativo de sobrevivência (FIGURA 5B e E), visto que os resultados obtidos de viabilidade se correlacionam com os obtidos de germinação. No entanto, em concordância com Santos (2000), a única evidência inquestionável da viabilidade do material é a retomada de crescimento e regeneração do explante após o descongelamento.

Após 30 dias da inoculação dos embriões criopreservados anteriormente tratados por 100 min em solução de PVS2 a 0°C e descongelados diretamente em RS foi observado que quando comparados visualmente a embriões não criopreservados (controle), estes estavam menos desenvolvidos em relação ao controle, apresentando uma menor expansão do eixo hipocótilo-radícula e dos cotilédones (FIGURA 6D).

Os embriões zigóticos são estruturas complexas com uma composição celular heterogênea que pode apresentar diferenças em sensibilidade ao congelamento. Aparentemente o meristema radicular é mais sensível em relação ao meristema apical, porém, independente da região meristemática, quando danos ocorrem diretamente nessas regiões, estes danos podem inibir ou retardar

o desenvolvimento do embrião após o congelamento (ENGELMANN, 2004, p. 427).

Após 60 dias do descongelamento os embriões que anteriormente tinham formado plântulas normais aos 30 dias, apresentavam uma raiz principal e a formação dos primeiros pares de folhas (FIGURA 6E).

#### 4.2.2 Determinação do tempo de descongelamento

Em relação ao tempo de descongelamento, observou-se que com o aumento do tempo em banho-maria em temperatura de  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  houve uma diminuição na porcentagem de germinação e na formação de plântulas normais (FIGURA 7).

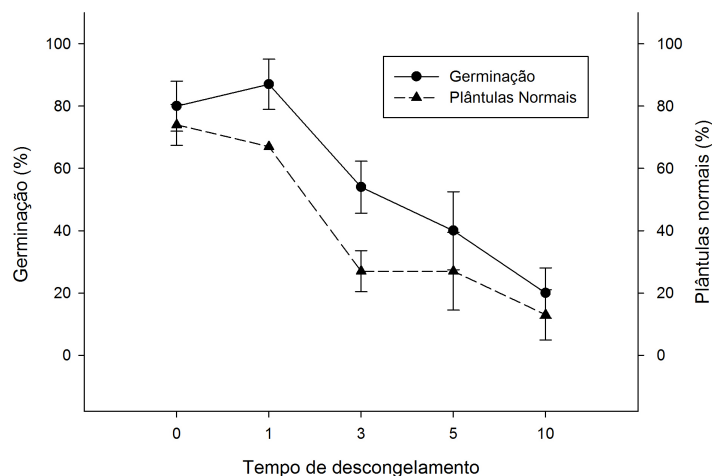


Figura 7 - Porcentagem de germinação e plântulas normais obtidas de embriões zigóticos criopreservados submetidos a diferentes tempos de descongelamento (0, 1, 3, 5 e 10 min) após 30 dias de cultivo. As barras representam o erro padrão da média de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A porcentagem de germinação e de formação de plântulas normais dos embriões descongelados por 1 min em banho-maria não diferiu estatisticamente dos embriões que foram descongelados diretamente em RS (tempo 0) por 15 minutos em temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Entretanto, ambos diferiram estatisticamente dos demais tempos avaliados (3, 5 e 10 min).

A diminuição da porcentagem de germinação bem como a formação de plântulas normais podem estar relacionadas a exposição desses embriões a temperatura de  $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  em banho-maria após o congelamento.

A medida que a temperatura aumenta durante o descongelamento, a viscosidade da solução crioprotetora diminui, assim os componentes penetrantes da solução de PVS2 utilizados anteriormente ao congelamento podem se difundir. Em consequência da difusão e do tempo prolongado de exposição a esses explantes, estes componentes podem se tornar tóxicos (YI et al., 2012). O que possivelmente pode ter causado a diminuição na porcentagem de germinação dos embriões após 3, 5 e 10 min.

No descongelamento em RS os componentes do PVS2 também se difundem, porém, o PVS2 é rapidamente lavado em RS, sendo desta forma, o PVS2 removido juntamente com a solução de RS.

Por isso, não havendo diferença estatística no descongelamento em RS e 1 min em banho-maria, o descongelamento pode ser diretamente em RS por 15 min em temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), pois a RS diminui a possibilidade de toxicidade das células e elimina a necessidade de uso do banho-maria.

#### **4.2.3 Análises histológicas**

Nos embriões apenas excisados (controle), foi observado por meio das seções longitudinais, que as células da região mediana do embrião estavam

túrgidas, sem a presença de grandes espaços intercelulares e com o conteúdo interno celular intacto (FIGURA 8A).

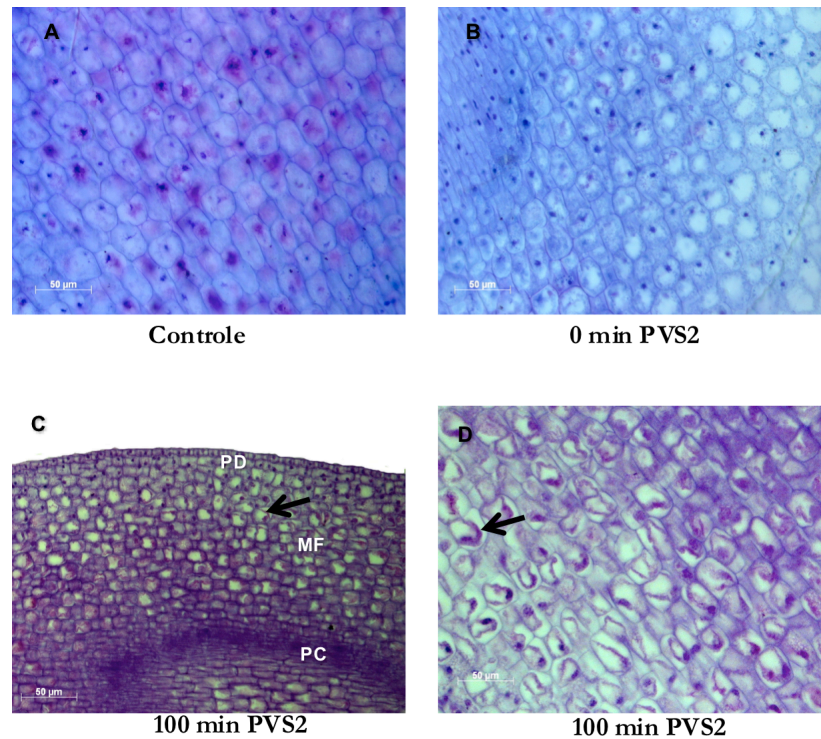


Figura 8 - Histologia comparativa da seção longitudinal de embrião de café arábica criopreservado com ou sem uso de PVS2 em relação ao não criopreservado (controle). (A) segmento mediano do controle (10x), (B) segmento mediano dos embriões congelados sem crioprotetor (10x), (C e D) Segmento mediano dos embriões congelados que anteriormente foram imersos por 100 min de PVS2, evidenciando-se plasmólise (seta) (4x e 10x). PD - protoderme; MF - meristema fundamental; PC – procâmbio.

Jeon et al., (2015) utilizando gemas apicais de crisântemo, observou que quando estas eram expostas ao NL sem imersão em solução crioprotetora as gemas apicais apresentaram danos visíveis de congelamento, com o núcleo celular irregular, citoplasma condensado, rupturas de membranas com extravasamento do material celular e o desaparecimento da parede celular,

porém em relação as células da região mediana dos embriões que foram criopreservados sem o uso de PVS2 não foi observado grande alterações celulares ocasionado por danos de congelamento (FIGURA 8B).

Diferentemente dos tratamentos descritos anteriormente, os embriões criopreservados que foram imersos em solução de PVS2 por 100 min a temperatura de 0°C, apresentaram plasmólises nas células da região mediana (FIGURA 8C e 8D).

As plasmólises observadas são devido ao efluxo de água pela ação osmótica da solução crioprotetora utilizada. A ação conjunta da diminuição do conteúdo de água observado devido a presença de plasmólises, juntamente com a ação vitrificante do PVS2 durante o rápido congelamento permite que os embriões sejam criopreservados e após o descongelamento possam retomar o seu crescimento *in vitro*.

Da mesma forma como observado neste trabalho, em um estudo histológico realizado por Mari et al. (1995) com ápices criopreservados de café das espécies *C. racemosa* e *C. sessiliflora*, mostrou que após a desidratação e o congelamento as células meristemáticas dos ápices sobreviventes apresentavam um grande número de plasmólises com o citoplasma de forma mais denso. Assim como Yi et al. (2012) que também observaram plasmólises em seus tratamentos que tiveram o maior valor de regeneração, evidenciando que o efluxo de água celular é necessário para que haja o congelamento e posterior retomada de crescimento do explante.

O acúmulo de amido tem sido uma observação recorrente em trabalhos histológicos como uma das primeiras modificações celulares observadas, como por exemplo em ápices de café (MARI et al., 1995) e inhame (BARRACO et al., 2013). Entretanto, diferentemente destes trabalhos não foi observado acúmulo de amido em nenhum dos embriões zigóticos avaliados independentemente do tratamento. Possivelmente, a não visualização de acúmulo de amido é devido a



não realização da etapa opcional de pré-cultivo com alta concentração de sacarose. Durante essa etapa a sacarose que é um crioprotetor não penetrante, é clivada e seus produtos entram na célula, onde são convertidos a amido, sendo possível desta forma ser visualizado em estudos histológicos após a criopreservação (SAJINI et al., 2011).

#### 4.2.4 Aclimatização

Após 60 dias da aclimatização 80% das plantas controles oriundas de embriões que não foram criopreservados sobreviveram e apresentaram crescimento tanto da parte aérea quanto do sistema radicular, porém, as plantas oriundas de embriões criopreservados apresentaram uma baixa taxa de sobrevivência, sendo que apenas 13% dessas plantas sobreviveram durante a aclimatização (TABELA 2) (FIGURA 6F).

Tabela 2 - Valores médios das avaliações de aclimatização após o período de 60 dias.

Tratamentos	Tempo (min)				
	S	NF	APA	NR	CR
Controle	80,2a	8,20a	1,84a	2,60a	3,32a
Criopreservado	13,2b	0,73b	0,23b	0,26b	0,20b

\* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. S – porcentagem de sobrevivência; NF – número de folhas; APA – Altura da parte aérea (cm); NR – número de raízes; CR – comprimento de raiz (cm).

Ao final da aclimatização, em todas as variáveis analisadas o controle apresentou maiores valores médios em relação as plantas oriundas de embriões criopreservados (TABELA 2). A baixa taxa de sobrevivência, assim como o menor desenvolvimento das plântulas oriundas de embriões anteriormente criopreservados pode estar relacionado a necessidade de um maior tempo de permanência dessas plantas *in vitro* e a necessidade de uso de reguladores de

crescimento para um maior desenvolvimento *in vitro* anterior a fase de aclimatização.

Bojórquez-Quintal et al. (2011), observaram em seus experimentos com diferentes reguladores de crescimento em embrião zigóticos de *C. arabica*, que o tempo de germinação dos embriões e o tempo de estabelecimento das plantas no solo podem ser reduzidos devido a aplicação dos reguladores de crescimento. Por isso, subcultivos após a criopreservação com uso de reguladores de crescimento pode possivelmente influenciar positivamente para um maior crescimento e desenvolvimento das plântulas anterior ao período de aclimatização, o que certamente aumentaria a taxa de sobrevivência final.

## 5 CONCLUSÃO

A criopreservação de embriões zigóticos de *C. arabica* é possível por meio da técnica de vitrificação após a imersão dos embriões por 100 min em solução vitrificante PVS2 a 0°C e descongelados diretamente em *Recovery Solution*.

## REFERÊNCIAS

- ALEMÁN, E. I. et al. Effects of EMFs on some biological parameters in coffee plants (*Coffea arabica* L.) obtained by *in vitro* propagation. **Polish Journal of Environmental Studies**, Olsztyn, v. 23, n. 1, p. 95–101, Jan. 2014.
- ALVAREZ-PARDO, V. M.; FERREIRA, A. G.; NUNES, V. F. Seed disinfestation methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 217–220, Apr./Jun. 2006.
- ARAUJO, R. F. et al. Conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L.) despoldado e não despoldado. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 71–78, Jun. 2008.
- BARRACO, G. et al. Histocytological analysis of yam (*Dioscorea alata*) shoot tips cryopreserved by encapsulation-dehydration. **Protoplasma**, v. 251, n. 1, p. 177–189, Jan. 2014.
- BOJÓRQUEZ-QUINTAL, J. E. et al. Effect of plant growth regulators on *in vitro* germination of coffee zygotic embryos. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 10, n. 82, p. 19056–19065, Dez. 2011.
- BORÉM, F. M. **Pós-colheita do café**. Lavras: UFLA, 2008. 631p.
- BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, 2009, p. 399.
- CHAARI-RKHIS, A. et al. Photosynthesis parameters during acclimatization of *in vitro*-grown olive plantlets. **Photosynthetica**, Praha, v. 53, n. 4, p. 613–616, Dez. 2015.
- CLEMENTE, A. D. C. S.; CARVALHO, M. L. M. DE; GUIMARÃES, R. M. Suitability of the tetrazolium test methodology for recently harvested and stored coffee seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 4, p. 415–423, Jul./Aug. 2012.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO: **Primeiro levantamento**

**safra 2016.** Disponível em:

[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_01\\_20\\_17\\_01\\_56\\_bol\\_etim\\_cafe\\_-\\_janeiro\\_2016.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_01_20_17_01_56_bol_etim_cafe_-_janeiro_2016.pdf) Acesso em: 13 Abril 2016.

DAVIS, A. P. et al. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 152, n. 4, p. 465–512, Dez. 2006.

DE LA CRUZ G., ESTRADA S., OROZCO S., LABRADA P. M. **Methodology to micropropagate and biochemical identification of coffee plants varieties.** 1 ed. Publicaciones Instituto Jorge Domitrov. Bayamo. Granma, Cuba. p. 61.1992.

DULLOO, M. E. et al. Cost efficiency of cryopreservation as a long-term conservation method for coffee genetic resources. **Crop Science**, Melbourne, v. 49, n. 6, p.2123-2138, Dez. 2009.

DELOUCHE, J.C.; STILL, T.W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. **O teste de tetrazólio para viabilidade da semente.** Brasília: AGIPLAN, 1976. 103 p.

DUSSERT, S.; CHABRILLANGE, N., ENGELMANN, F.; ANTHONY, F.; VASQUEZ, N.; HAMON, S. Cryopreservation of *Coffea* (Coffee) In: TOWILL, L.E.T.; Bajaj, Y.P.S. (Eds). **Biotechnology in Agriculture and Forestry: Cryopreservation of Plant Germplasm II.** v. 50 Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2002. p. 224-233.

DUSSERT, S. et al. Cryopreservation of seeds of four coffee species (*Coffea arabica*, *C-costatifructa*, *C-racemosa* and *C-sessiliflora*): Importance of water content and cooling rate. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 8, n. 1, p. 9–15, Sep. 1998.

DUSSERT, S. et al. Cryopreservation of coffee (*Coffea Arabica* L.) Seeds: Importance of the precooling temperature. **Cryo Letters**, Cambridge, v. 18, n. 5, p. 269–276, 1997.

DUSSERT, S.; ENGELMANN, F. New determinants for tolerance of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds to liquid nitrogen exposure. **Cryo Letters**, Cambridge, v. 27, n. 3, p. 169–178, May./Jun. 2006.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: Progress and prospects. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 40, n. 5, p. 427–433, Sept./Oct. 2004.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, Columbia, v. 47, n. 1, p. 5–16, Feb. 2010.

FAO Statistical Pocketbook 2015 - **Coffee**. Disponível em: <<http://www.fao.org/documents/card/en/c/f0dd1f3c-fddd-48de-b6a6-7b5840ea8d85/>>. Acesso em: 3 Abril 2016.

FERREIRA D.F. Sisvar: A guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, Mar./Apr. 2014.

FISHER, D.B. Protein sustaining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie*, v. 16 p. 92-96, Sep./Oct. 1968.

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. 2007.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, Assam, v. 108, n. 2, p. 105–120, Apr. 2006.

HUYLENBROECK, J. V.; PIQUERAS, A.; DEBERGH, P. The evolution of photosynthetic capacity and the antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated Calathea plants. *Plant Science*, Limerick, v. 155, n. 1, p. 59–66, Jun. 2000.

JEON, S. M.; et al. Application of encapsulation-vitrification in combination with air dehydration enhances cryotolerance of *Chrysanthemum morifolium* shoots tips. *Scientia Horticulturae*, Assam, v. 194, p. 91–99, Oct. 2015.

KARTAL, S. N.; HWANG, W-J.; IMAMURA, Y. Water absorption of boron-treated and heat-modified wood. *Journal of Wood Science*, v. 53, n. 5, p. 454–457, Oct. 2007.

KIM, H.H. et al. Development of alternative plant vitrification solutions in droplet-vitrification procedures. *Cryo Letters*, Cambridge, v. 30, n. 5, p. 320–334, Sep./Oct. 2009.

LAMBARDI, M.; FABBRI, A.; CACCAVALE, A. Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of *in vitro*-grown shoot tips. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 3, p. 213–218, Jan. 2000.

LASHERMES, P. et al. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 261, n. 2, p. 259–266, Mar. 1999.

LESAR, B.; HUMAR, M. Re-evaluation of fungicidal properties of boric acid. **European Journal of Wood and Wood Products**, Berlin, v. 67, n. 4, p. 483–484, May. 2009.

LIU, Q. et al. Cryopreservation of chinese old roses (*Rosa Chinensis* Jacq.) shoot tips by vitrification. **Propagation of Ornamental Plants**, Sofia, v. 15, n. 1, p. 35–41, Fev. 2015.

MARI, S. et al. Histocytological study of coffee (*Coffea racemosa* and *C. sessiliflora*) apices of *in vitro* plantlets during their cryopreservation using the encapsulation-dehydration technique. **Cryo Letters**, Cambridge, v. 16, n. 5, p. 289-298, 1995.

MATSUMOTO, T., SAKAI, A., YAMADA, K. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 13, n. 8, p.442-446, May. 1994.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473–497, Jul. 1962.

NADARAJAN, J.; PRITCHARD, H. W. Biophysical characteristics of successful oilseed embryo cryoprotection and cryopreservation using vacuum infiltration vitrification: An innovation in plant cell preservation. **Plos One**, California, v. 9, n. 5, p. e96169, May. 2014.

NAIDU, M. M.; SREENATH, H. L. *In vitro* culture of coffee zygotic embryos for germplasm preservation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 55, n. 3, p. 227–230, Dec. 1999.

NASS, L. L.; NISHIKAWA, M. A. N.; FÁVERO, A. P.; LOPES, M. A. Pré-melhoramento de germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (Org). **Recursos**

**genéticos vegetais.** Brasília: Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia, 2008. p. 683-716.

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

RODRIGUES, M. et al. Growth and photosynthetic responses during *ex vitro* acclimatization of *Etilingera elatior* (Jack) rm smith (torch ginger). **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 37, n. 4, p. 495, Oct./Dec. 2015.

SAJINI, K. K. et al. Cryopreservation of coconut (*cocos nucifera* L.) zygotic embryos by vitrification. **Cryo Letters**, Cambridge, v. 32 n. 4, p. 317–328, Jul./Aug. 2011.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: A review. **Cryo Letters**, Cambridge, v. 28, n. 3, p. 151–172, Mai./Jun. 2007.

SAKAI, A., KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.9, n.1, p.30-33, Jun. 1990.

SAN JOSÉ, M. Del C. et al. Cryopreservation of somatic embryos of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. and confirmation of ploidy stability by flow cytometry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 123, n. 3, p. 489–499, Dec. 2015.

SANTANA-BUZZY, N. et al. Advances in coffee tissue culture and its practical applications. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 43, n. 6, p. 507–520, Aug. 2007.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.12, n.1, p. 70-94, 2000. Edição especial.

SILVA, L. C. et al. Cryopreservation of *Byrsonima intermedia* embryos followed by room temperature thawing. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá. v. 36, n. 3, p. 309, Jul./Sep. 2014.

SIMOES-COSTA, M. C.; CARAPUCA, E.; MOURA, I. R. Somatic embryogenesis induction in different genotypes of *Coffea* spp. **Acta Horticulturae**, v. 812, p. 295–299, 2009.



SOUZA, F.F.; SANTOS, J.C.F.; COSTA, J.N.M.; SANTOS, M.M.  
**Características das principais variedades de café cultivadas em Rondônia.** Porto Velho, 2003. 23p.

SRIDHARAN, G.; SHANKAR, A. A. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. **Journal of oral and maxillofacial pathology**, v. 16, n. 2, p. 251–255, May. 2012.

TAO, D.; LI, P. H. Classification of plant cell cryoprotectants. **Journal of Theoretical Biology**, v. 123, n. 3, p. 305–310, Dec. 1986.

VALDÉS, Y. C. Conservación de recursos fitogenéticos de cafeto (*Coffea spp.*) por métodos biotecnológicos: Una alternativa para su preservación. **Cultivos Tropicales**, La Habana, v. 33, n. 4, p. 29–39, Oct. 2012.

VOLK, G. M.; WALTERS, C. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. **Cryobiology**, San Diego, v. 52, n. 1, p. 48–61, Feb. 2006.

VOSSSEN, H. V.; BERTRAND, B.; CHARRIER, A. Next generation variety development for sustainable production of arabica coffee (*Coffea arabica* L.): A review. **Euphytica**, Wageningen, v. 204, n. 2, p. 243–256, Feb. 2015.

WEN, B. et al. Cytological and physiological changes in recalcitrant Chinese fan palm (*Livistona chinensis*) embryos during cryopreservation. **Protoplasma**, v. 249, n. 2, p. 323–335, Abr. 2012.

YI, J.-Y. et al. Improved cryopreservation using droplet-vitrification and histological changes associated with cryopreservation of Madder (*Rubia akane Nakai*). **Korean Journal of Horticultural Science and Technology**, v. 30, n. 1, p. 79–84, Feb. 2012.