FERNANDA PICCOLO PIERUZZI

CRIOPRESERVAÇÃO DE *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KUNTZE: ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

FERNANDA PICCOLO PIERUZZI

CRIOPRESERVAÇÃO DE *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KUNTZE: ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Eny lochevet Segal Floh

Versão original

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Pieruzzi, Fernanda Piccolo.

Criopreservação de *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. Kuntze: Aspectos fisiológicos e bioquímicos / Fernanda Piccolo Pieruzzi. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Eny Lochevet Segal Floh.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Fisiologia vegetal.

Versão do título para o inglês: Cryopreservation of *Araucaria* angustifolia (BERT.) O. Kuntze: Physiological and biochemical aspects.

1. Biotecnologia 2. Criopreservação 3. *A. angustifolia* 4. Cultura de células vegetais 5. Reguladores vegetais 6. Sementes recalcitrantes I. Floh, Profa. Dra. Eny Lochevet Segal II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0202/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a):	Fernanda Piccolo Pieruzzi.
Título da Tese:	Criopreservação de Araucaria angustifolia (BERT.) O. Kuntze: Aspectos fisiológicos e bioquímicos.
Orientador(a):	Profa. Dra. Eny Lochevet Segal Floh.
	ão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a, considerou () Aprovado(a) () Reprovado(a)
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Aos meus avós, Adélia M. P. Pieruzzi e Renato G. Esteves (*in memoriam*), com todo o amor,

AGRADECIMENTOS

Com alegria, agradeço a todos que axiliaram direta ou indiretamente, ao longo de todo o projeto, tornando possível a relização deste trabalho.

À Universidade de São Paulo pela oportunidade, condições de trabalho disponibilizadas e aos diferentes canais de aprendizagem oferecidos.

À Fundação de Pesquisa de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) pelo curso de doutorado e ao Instituto de Biociências (IB), bem como seus funcionários, onde a maior parte do projeto foi executado.

Aos meus pais, Elio e Cleide, minha irmã, Paula, meus avós Renato Esteves (*in memoriam*) e Adélia Pieruzzi, pelo apoio, incentivo e auxílio (inclusive diretamente na execução do projeto), à Harue Tateishi, por auxiliar no meu desenvolvimento pessoal ao longo desses anos. Aos meus pais americanos, Marilyn e Steve Brown por acolher, ensinar e torcer sempre.

À profa. Eny Floh pela oportunidade, orientação, confiança e amizade durante não apenas o doutorado, mas toda a minha trajetória acadêmica, na qual foi orientadora.

Aos integrantes do BIOCEL durante o projeto, Carmem Silva, Amanda Macedo e Leandro Salles pelo auxílio técnico, André dos Santos e Leandro de Oliveira e Amanda Mosini, pela amizade e convivência, à Natália Piscirillo, Sâmila Lopes, Leonardo Jo, Julia Andrade, Ana Carolina Abreu, Igor Sicchi, e principalmente à Caroline Bueno (e Dani Penido) pelo auxílio na execução, discussões fundamentais ao longo do projeto, adaptação dos protocolos e aprendizado dentro e fora da universidade.

À Dra. Christina Walters, pela colaboração, ensinamentos, orientação, hospedagem e paciência nos experimentos com os embriões zigóticos e escrita da tese, além da abertura para a utilização do espaço físico e recursos dos laboratórios do NCGRP - ARS - USDA, em Fort Collins, CO - EUA, na execução de parte do projeto. Aos demais funcionários e pesquisadores do NCGRP, Lisa Hill, John Waddel, Pat Reeves, Dani Ballesteros, Jennifer Crane, Gayle Volk, Jennifer Kendall, Adam e Shanna Henk, Remi Bonnart, Annete Miller e Joseph Duchene, pela

paciência, auxílio nos experimentos, incentivo, amizade e inclusão, além da minha "adoção" por John Wadell e a seleção musical de David Noroski, que ainda hoje ajuda a enfrentar as longas horas de trabalho.

Ao Prof. Diego DeMarco pela colaboração, orientação e auxílio no trabalho de anatomia dos embriões zigóticos executado no Laboratório de Anatomia Vegetal do Instituto de Biociências – USP, ebm como o técnico Irwandro Pires, pela importante participação na execução dos cortes semifinos.

Aos funcionários da secretaria do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Eliana, Fábia e Marco, pelo auxilio.

Aos amigos e colegas do Serviço Florestal Brasileiro, em especial à Daniel Piotto, Cláudia Rosa, Ana Laura Trindade, Eder Junior, Maria Maragon, Juliana Gomes, Raiane Viana, Tiago Thomazi, Cássio Araújo, Raquel Leão, Rafael Carvaho, Regiane Azevedo, Evie Negro, Marta Franco, Rossana Carneiro, Monique Santos, Hugo Bras, Sandra De Carlo, Lucas Oliveira, Alexandre Gontijo, Rafael Oliveira e Sabóia, pelo apoio, compreensão e auxílio e inúmeras caronas.

Aos amigos pesquisadores, Tiago Balbuna, Leonardo Dias, Murilo Guimarães, Augusto Tomba, Aline Rodrigues, Juliana Almeida, Maria Cecília, Danilo Bernardo, Aline Teixeira e Roberta Martins pelo auxílio técnico, apoio, carinho, incentivo e descontração ao longo da jornada.

Aos amigos Bruna Sousa, Camila, Rafal e Renata Goto, Luciana Massuda, Vitor Sarno e Gregor Biasibetti, pelo apoio e compreensão e que resitiram às inúmeras ausências, e à Luciana Jesus e Guilherme Del Padre, pela breve convivência, intensa troca e eterna amizade.



RESUMO

PIERUZZI, F. P. **Criopreservação de Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze**: aspectos fisiológicos e bioquímicos. 2013. 140 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O longo período para alcançar o estádio reprodutivo, a fenologia irregular e a recalcitrância de sua semente dificultam o estabelecimento de programas de conservação para Araucaria angustifolia, arbórea nativa ameacada de extinção. Técnicas de cultivo in vitro, associadas à criopreservação, são ferramentas importantes para conservação ex situ de espécies recalcitrantes. O objetivo deste trabalho foi o estudo da criopreservação no sistema A. angustifolia. Um protocolo de criopreservação para culturas celulares foi desenvolvido, baseado na otimização das concentrações de DMSO. Apenas o tratamento que utilizou 20% de DMSO apresentou recuperação significativa após cinco semanas após o reaquecimento, sendo o tratamento mais promissor. Observou-se que as células expostas aos crioprotetores apresentaram níveis mais baixos de PAs, ABA e ROS, em comparação às células que não foram expostas aos mesmos. Duas bandas protéicas de baixo peso molecular foram mais intensamente coradas apenas nas células que sofreram exposição aos crioprotetores. O embrião zigótico foi utilizado para o estudo de diferentes aspectos biofísicos do processo de criopreservação como a permeabilidade dos crioprotetores, a capacidade de resposta osmótica e resistência ao congelamento dos tecidos. Embriões foram desidratados por secagem ultrarrápida, meio WPM contendo 2M de sacarose, ou PVS2. As taxas de desidratação foram avaliadas em cinco segmentos do embrião, sendo observada maior resistência nos segmentos intermediários: 2 e 3. Embriões dessecados abaixo de 0,5 g H₂0.g MS⁻¹, por de secagem ultrarrápida (12 h), apresentaram escurecimento e falha para reidratar. Os embriões dessecados a cerca de 0,45 g H₂0.g MS⁻¹, usando 2 M de sacarose (8 h), foram recuperados por reidratação. O conteúdo de água de embriões embebidos em PVS2 (2 h), após pré-tratamento com sacarose 2M, apresentaram conteúdo de água reduzido para 0,35 g H₂0.g MS⁻¹, sem variação entre os segmentos, e também puderam ser recuperados após reidratação. Penetração diferencial de PVS2 foi observada. A análise por microscopia óptica foi realizada em embriões diretamente expostos ao nitrogênio líquido ou submetidos ao tratamento de 2M de sacarose (8 h), seguido de PVS2 (2 h), (seguido ou não de resfriamento) e recuperação em meio contendo 1,2 M sacarose. Observou-se a presença marcante de grãos de amido em todos os tecidos do embrião. Embriões expostos aos diferentes tratamentos apresentaram um maior número de células mortas, regiões de heterocromatina e maior espaçamento intercelular, quando comparados ao controle, não resfriado. O tratamento que envolveu todas as etapas do procedimento de criopreservação foi o que apresentou espaçamentos maiores e mais frequentes. Apesar dos danos acentuados nos embriões resfriados, variação ao longo dos segmentos estudados foi Os resultados deste trabalho permitiram uma melhor compreensão dos observado. diferentes aspectos fisiológicos, bioquímicos e biofísicos durante a criopreservação, em espécies recalcitrantes, auxiliarão o estabelecimento de bancos de germoplasma ex situ para A. angustifolia.

Palavras-chave: *Araucaria angustifolia*. Criopreservação. Semente recalcitrante. Cultura celular. Poliaminas. Ácido abscísico. Espécies reativas de oxigênio. Proteínas.

ABSTRACT

PIERUZZI, F. P. Cryopreservation *of Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze: physiological and biochemical aspects. 2013. 140 p. Ph. D. thesis (Doctor in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The ex situ conservation of Araucaria angustifolia, Brazilian endangered pine, is limited mainly because the recalcitrance of the seed. In vitro techniques associated with cryopreservation are important tools for the conservation of species with recalcitrant seeds. The aim of this work was the study of cryopreservation A. angustifolia plant systems. A protocol for cryopreservation of A. angustifolia cell cultures was developed based on optimum DMSO concentration. Only the treatment with 20% of DMSO could be recovered with significant amount of cells after five weeks of thawing. Then that was the more promising treatment for cryopreservation of cell cultures of A. angustifolia used. It was observed that cells exposed to cryoprotectants showed lower levels of PAs, ABA and ROS compared to cells that were not exposed to them. Two low molecular weight bands could be observed more intensely stained only in the cells that were exposed to the cryoprotectant. The zygotic embryos were used as a model to study different aspects of the biophysical process of cryopreservation such as the permeability of cryoprotectants, osmotic and response characteristics of water freezing in tissue. Embryos were dehydrated flash-drying, WPM media containing 2M sucrose or PVS2. Dehydration rates were evaluated in five segments of the embryo, and a higher resistance to water loss occurred in the intermediate segments: 2 and 3. Embryos desiccated below 0.5 g H20.g ⁻¹ MS (12 h), by flash-drying showed darkening and fail to rehydrate. Embryos desiccated to about 0.45 g H20.g MS- 1 using 2 M sucrose (8 h) were recovered by rehydration. The water content of the embryos embedded in PVS2 (2 hours) after pretreatment with 2M sucrose showed reduction to 0.35 g H₂0.g MS⁻¹, and also could be recovered after rehydration. However, a higher penetration PVS2 the radicle end region (part 1) can be observed. Analysis of the organization and aspects of cellular structures by optical microscopy was performed. Embryos directly exposed to liquid nitrogen or submitted to the treatment of 2M sucrose (8 h), followed PVS2 (2 h) (or not followed by cooling) and recovery in media containing 1.2 M sucrose. We observed a marked presence of starch grains in all tissues of the embryo. The embryos exposed to different treatments showed an increased in number of dead cells, heterochromatic regions in the nucleus and showing greatest intercellular spacing when compared to control not cooled. Among the treatments, the one involving all stages of the cryopreservation showed the intercellular spacings more frequently and visibly. It seems that damages vary along the segments studied. The results of this work led to a better understanding of different physiological, biochemical and biophysical factors during cryopreservation in recalcitrant species and open perspective to the establishment of the ex situ conservation of A. angustifolia.

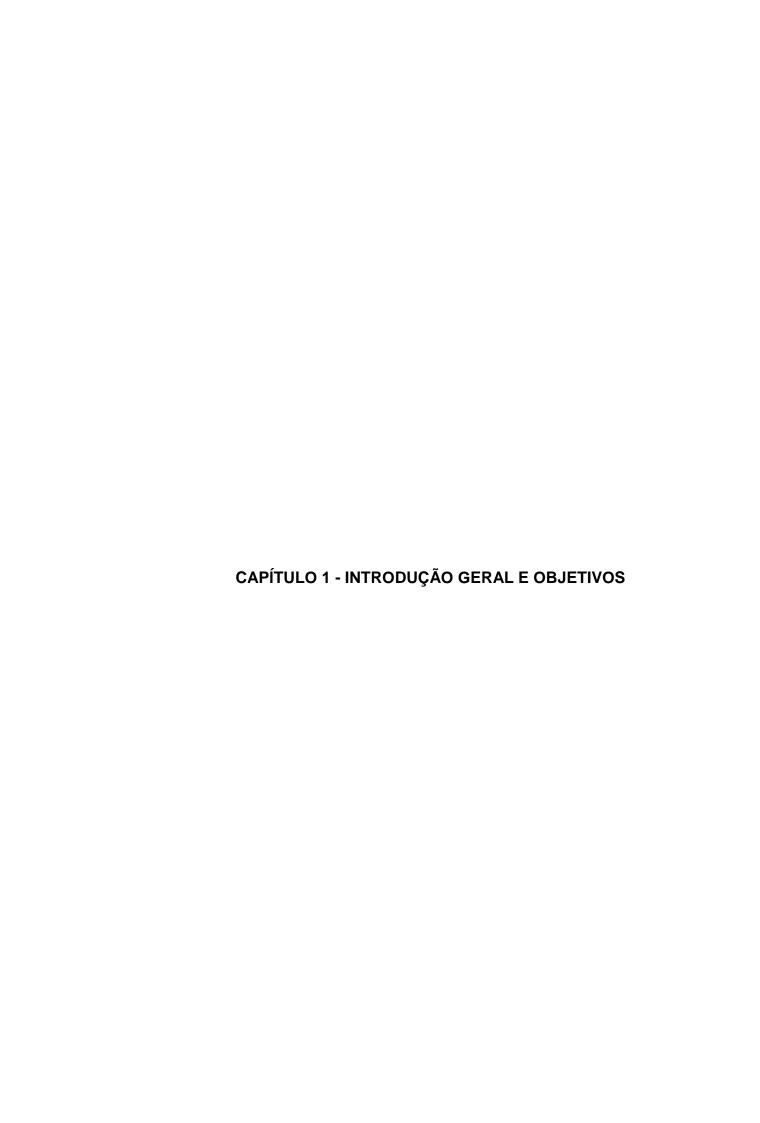
Keywords: *Araucaria angustifolia*. Cryopreservation. Recalcitrant seed. Cell culture. Polyamines. Abscisic acid. Reactive oxygen species. Protein.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS	13
1.1 Introdução	14
1.1.1 Conservação ex situ de germoplasma	14
1.1.1.1 Conservação de espécies com sementes recalcitrantes	15
1.1.2 A técnica de criopreservação	16
1.1.1.2 Técnica clássica de criopreservação ou resfriamento em duas etapas	18
1.1.1.3 <u>Vitrificação</u>	20
1.1.3 Aspectos fisiológicos e bioquímicos da criopreservação	23
1.1.4 O sistema Araucaria angustifolia	26
1.2 Objetivos	27
1.2.1 Objetivo geral	28
1.2.2 Objetivos específicos	28
CAPÍTULO 2 - ASPECTOS BIOQUÍMICOS DO PROCESSO DA CRIOPRESERVAÇÃO EM CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>A. angustifolia</i> : POLIAMINAS, ÁCIDO ABCÍSICO E PERFIS PROTÉICO	29
2.1 Introdução	
2.2 Material e métodos	
2.2.1 Material vegetal	34
2.2.2 Metodologias	35
2.2.2.1 Indução das culturas embriogênicas	35
2.2.2.2 <u>Metodologia de criopreservação</u>	35
2.2.2.2.1 Pré-cultivo e congelamento	
2.2.2.2 Descongelamento e recuperação	36
2.2.2.3 Análises bioquímicas	37

2.2.2.3.1 Material vegetal	37
2.2.2.3.2 Padrão e conteúdo de PAs	39
2.2.2.3.3 Conteúdo de ABA	40
2.2.2.3.4 Conteúdo de ROS	41
2.2.2.3.5 Perfil protéico	41
2.2.2.4 Amostragem e análise estatística	42
2.3 Resultados e discussão	42
CAPÍTULO 3 - ANÁLISE DE TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE <i>A. angustifolia</i> 1	51
3.1 Introdução	
3.2 Material e métodos	56
3.2.1 Material vegetal	56
3.2.2 Metodologias	57
3.2.2.1 <u>Métodos de desidratação</u>	57
3.2.2.1.1 Desidratação ultrarrápida (flash-drying)	57
3.2.2.1.2 Desidratação a partir de substâncias crioprotetoras	58
3.2.2.2 Avaliação dos tecidos	59
3.2.2.2.1 Derrame de eletrólitos	59
3.2.2.2.2 Ensaio de viabilidade com glutationa	59
3.2.2.2.3 Determinação do conteúdo de água	59
3.2.2.2.4 Determinação do potencial osmótico	60
3.2.2.2.5 Análise das propriedades térmicas da água em DSC (<i>Differential Scann</i>	_
3.2.2.3 Análise de dados	61
3.3 Resultados e discussão	61
3.3. 1Efeitos da dessecação ultrarrápida ou com crioprotetores	61

3.3.2 Análise das propriedades térmicas da água em DSC	70
3.3.3 Efeito da glutationa na desidratação ultrarrápida	76
CAPÍTULO 4 - ASPECTOS HISTOLÓGICOS DURANTE O PROCEDIMENTO D CRIOPRESERVAÇÃO NOS EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE <i>A. angustifolia</i> ²	
4.1 Introdução	81
4.2 Material e métodos	83
4.2.1 Material vegetal	83
4.2.2 Metodologias	84
4.2.2.1 Avaliação histológica	84
4.2.2.1.1 Análise do embrião inteiro	84
4.2.2.1.2 Análise da organização e aspecto das estruturas celulares	85
4.3 Resultados e discussão	85
CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	95
REFERÊNCIAS*	98
APÊNDICE - Artigo submetido para publicação: establishing a protocol for cryopreservation of cell cultures of <i>A. angustifolia</i> : biophysical effects of cryoprotectants on cell survival	120



1.1 Introdução

1.1.1 Conservação ex situ de germoplasma

Desde a sua descoberta, os recursos florestais envolvendo espécies nativas têm sido amplamente explorados no Brasil de forma indiscriminada, levando a inclusão de várias arbóreas nativas na lista de espécies ameaçadas de extinção (CARVALHO, 1994). A restauração dos ambientes degradados a curto e médio prazo é necessária, não apenas para a recuperação dessas espécies na natureza, mas também para a conservação dos recursos naturais, possibilitando uma exploração sustentável dos mesmos. Nesse sentido, o desenvolvimento de bancos in situ e ex situ de germoplasma é um pré-requisito para a viabilização dos programas de conservação (FAO, 2009; GROSSNICKLE; SUTTON, 1999).

A formação e manutenção de bancos de germoplasma de variedades locais e parentes silvestres de espécies agrícolas e florestais tem sido uma das temáticas mais relevantes da pesquisa em botânica. Desde o início, diversos programas destinam-se a prevenir a erosão genética e a promover uma melhoria da produtividade agrícola e florestal (IBPGR, 1993). Os estudos nesta área tem foco no desenvolvimento de técnicas para a conservação ao longo prazo da variabilidade genética de espécies vegetais, com a máxima integridade biológica e genética possíveis (BAJAJ, 1995; HÄGGMAN; RUSANEN; JOKIPII, 2008; PANIS; LAMBARDI, 2005; STUSHNOFF; SEUFFERHELD, 1995). A maioria das espécies cultivadas na agricultura é conservada de forma *ex situ*, utilizando estratégias como bancos de sementes, plantio em campo e cultura de tecidos. Na área florestal, a conservação *in situ* das espécies é geralmente integrada à programas de manejo (YEATMAN, 1987), aumentando-se as áreas de reservas florestais gerenciadas, além de áreas de proteção integral (WANG; CHAREST; DOWNIE, 1993).

As sementes são a principal unidade de propagação natural em plantas e, por essa razão, seu armazenamento é a forma mais comum de conservação vegetal *ex situ* (SANTOS, 2001). Dentre os métodos utilizados, a criopreservação é atualmente a única técnica disponível para a manutenção em longo prazo de germoplasma de espécies vegetais que são propagadas vegetativamente ou que apresentam sementes recalcitrantes ou intermediárias (SANTOS, 2000). Entretanto, a

capacidade da planta em ser criopreservada depende da sua tolerância à desidratação e à redução da temperatura (STUSHNOFF; SEUFFERHELD, 1995). Durante os procedimentos de criopresevação, as estruturas biológicas são expostas à condições muito diferentes daquelas encontradas em condições fisiológicas normais. Dessa forma, podem sofrer danos devido à redução da temperatura e/ou congelamento como injúrias nos sistemas lipossomais estruturais ácidos nucleicos (WALTERS et al., 2008). Sob tais condições, diferentes compostos podem ser produzidos pelas células vegetais, sinalizando uma situação de estresse. Dentre estas substâncias, podem-se destacar as poliaminas (PAs), o hormônio ácido abscísico (ABA), espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteínas (JARZĄBEK; PUKACKI; NUC, 2009; RAMON et al., 2002; UCHENDU et al., 2010).

O desenvolvimento de um protocolo de criopreservação requer o conhecimento dos mecanismos de respostas das células quando submetidas às condições de desidratação e resfriamento (JARZĄBEK; PUKACKI; NUC, 2009; STUSHNOFF; SEUFFERHELD, 1995). Nesse sentido, o entendimento dos eventos bioquímicos e fisiológicos, ao longo do processo de criopreservação permite a identificação de padrões e assim, o desenvolvimento de protocolos menos empírcos e mais eficientes.

1.1.1.1 Conservação de espécies com sementes recalcitrantes

A manutenção de um estoque de sementes é imprescindível para a perpetuação das espécies, sendo fonte de recursos genéticos e estoque de alimentos para seres humanos e animais. O sucesso no armazenamento das sementes depende da capacidade das mesmas em resistirem à redução de temperatura e dessecação que, por sua vez, está relacionada à fisiologia do desenvolvimento de cada espécie (BERJAK; PAMMENTER, 2008). Em relação à resistência ao armazenamento, podemos classificar as sementes em ortodoxas ou recalcitrantes.

As sementes ortodoxas são aquelas que podem ser dessecadas a aproximadamente 5% do teor de umidade inicial, e armazenadas à temperaturas de aproximadamente -18 °C, sem que ocorra a perda de sua viabilidade (ROBERTS, 1973). Nestas condições, podem ser mantidas viáveis por muitas décadas, sendo,

portanto, a estratégia adotada na maioria dos bancos de sementes (SANTOS, 2000). Em contraste, as sementes recalcitrantes caracterizam-se por não resisitirem níveis de umidade abaixo de 15%. Frequentemente, perdem a sua viabilidade em poucos dias ou meses, após serem armazenadas, ou para as espécies de clima temperado, um ano ou dois, e não toleram temperaturas abaixo de zero (CHIN; ROBERTS, 1980).

Diferentemente das sementes ortodoxas, que se apresentam em estado quiescente após a maturação, as sementes recalcitrantes permanecem com metabolismo ativo e alto conteúdo de água, mesmo após a maturação (BERJAK; MYCOCK, 2004; FINCH-SAVAGE, 1996). Assim, são capazes de germinar logo após a sua dispersão utilizando a água presente na própria semente. Nestas condições, a criopreservação seria uma das únicas opções para a manutenção de sementes recalcitrantes, por longos períodos de tempo (BERJAK; PAMMENTER, 2008).

Alternativamente à conservação de sementes, é possível criopreservar tecidos e células utilizando técnicas *in vitro*. A possibilidade de criopreservação destes materiais permite que algumas barreiras da manutenção *in vitro* como a necessidade de frequentes subculturas, o risco de variação somaclonal em tecidos cultivados e envelhecimento das culturas, sejam eliminadas (ARNOLD et al., 2002; SANTOS, 2001; STASOLLA; YEUNG, 2003). Esta estratégia já é utilizada para as espécies vegetais que são propagadas mais comumente de forma vegetativa (Ex: mandioca, banana, batata), para a propagação de clones de interesse, ou espécies cujo estádio reprodutivo demora para ser atingido (DUMET; BENSON, 2000; GUERRA et al., 2000; KARTHA, 1985; LIU; WANG; LIU, 2004; STEFENON et al., 2008; WANG; CHAREST; DOWNIE, 1993). Recentemente, técnicas *in vitro* permitiram a recuperação de sementes de *Silene stenophylla* a partir de frutos enterrados por trinta e dois mil anos em camada de gelo siberiano (YASHINA et al., 2012).

1.1.2 A técnica de criopreservação

A criopreservação pode ser definida como a conservação de material biológico em nitrogênio líquido (-196 °C) ou em fase de vapor (-150 °C)

(ENGELMANN, 2004; PANIS; LAMBARDI, 2005). A redução metabólica que ocorre nas células, quando submetidas às temperaturas criogênicas, permite com que o material vegetal possa ser armazenado por um período teoricamente ilimitado de tempo (ENGELMANN, 2004). O sucesso desta técnica, no entanto, depende da combinação e eficiência de suas etapas: pré-resfriamento, resfriamento e reaquecimento (BENSON et al., 2006).

O primeiro registro de criopreservação foi realizado no final dos anos 40 (POLGE; SMITH; PARKES, 1949) apud Allen (1956). Estes autores registraram pela primeira vez a capacidade crioprotetora do glicerol que, quando adicionado ao diluente, permitiu com que o sémen de galo pudesse ser criopreservado. Entretanto, a observação de uma redução na fertilidade dos espermatozóides, observada no material controle, tratado com glicerol não foi congelado, também evidenciou a toxicidade dos crioprotetores (ALLEN, 1956).

Em plantas, o material a ser criopreservado deve ser coletado a partir de matrizes saudáveis. Em caso de se utilizar material *in vitro*, os parâmetros de cultura devem ser otimizados antes do procedimento de criopreservação (BENSON; LYNCH; JONES, 1992). Sementes ortodoxas, ou meristemas, são normalmente desidratados, sem pré-tratamento. Entretanto, a maioria dos materiais empregadas na criopreservação, como suspensões de células, calos, brotos e embriões, contêm grandes quantidades de água livre dentro das células (ENGELMANN, 2004) e devem ser desidratados, evitando a cristalização da água intracelular em gelo (MAZUR, 1984). Para tanto, podem ser utilizadas técnicas clássicas envolvendo desidratação por resfriamento em duas etapas, de vitrificação ou dessecação ultrarápida (*flash-drying*) (ENGELMANN, 2004).

A sobrevivência às temperaturas criogênicas requer a redução do conteúdo de água para evitar a formação de gelo durante o congelamento. Essa redução deve ocorrer de forma rápida, a fim de se reduzir o estresse causado durante o processo, evitando danos, normalmente fatais às sementes recalcitrantes (BERJAK; PAMMENTER, 2008). Frequentemente o tamanho de tais sementes é grande, e portanto, o seu resfriamento pode demorar a se completar. Nesta situação pode-se optar pela utilização apenas dos eixos embrionários, ou parte deles, durante os protocolos de criopreservação (BERJAK; PAMMENTER, 2004).

1.1.1.2 <u>Técnica clássica de criopreservação ou resfriamento em duas etapas</u>

As técnicas clássicas de criopreservação ou resfriamento em duas etapas (*two step-cooling*) têm sido aplicadas com sucesso em sistemas de culturas celulares como calos e suspensões. Nesta técnica, a desidratação do material ocorre de forma lenta, resultante do processo de um processo físico causado pelo resfriamento. A taxa de resfriamento ocorre de forma controlada até uma temperatura mínima pré-definida (em torno de -40 °C), durante a primeira etapa, seguida por uma rápida imersão em nitrogênio líquido, absegunda etapa (PANIS; LAMBARDI, 2005).

Na primeira etapa do procedimento, a redução da temperatura provoca o congelamento do meio externo, mas não das células, tornando-as super resfriadas. A membrana plasmática impede o congelamento intracelular, formando uma barreria física entre o gelo externo e o interior da mesma. Embora o ponto de congelamento do citoplasma ocorra geralmente em temperaturas abaixo de -1 °C, o que corresponde a concentrações menores que 0,5 M, neste sistema, as células permanecem geralmente em estado líquido entre - 10 ° ou -15 ° C, mesmo ocorrendo a formação do gelo no meio externo. Com o continuo decrescimo da temperatura ocorre um aumento do gelo extracelular, e como consequência, um aumento na concentração dos solutos da porção não congelada. A água presente no interior das células é submetida a um aumento na pressão de vapor, escapando para o compartimento externo, o qual está congelado. A intensidade de desidratação da célula, e a quantidade de gelo formado, dependem da velocidade do resfriamento. Após o total congelamento do meio extracelular, o material é então imerso em líquido, caracterizando a segunda etapa do procedimento nitrogênio criopreservação (ENGELMANN, 2004; MAZUR, 1984).

A velocidade do resfriamento é fator fundamental no processo e pode afetar diretamente os resultados da criopreservação. Como ilustrado na Fig. 1.1., um congelamento muito lento pode desidratar as células de forma excessiva e promover uma elevação na concentração de sais intracelulares. Ao mesmo tempo, o enrugamento causado pela desidratação pode ocasionar danos irreversíveis às membranas (MERYMAN; WILLIAMS; DOUGLAS, 1977). Por outro lado, no caso de um resfriamento ocorrer muito rapidamente, pode não haver tempo suficiente para

que ocorra a desidratação, e cristais de gelo intracelulares podem se formar no interior da célula, causando danos à estrutura física das mesmas (STEPONKUS; WEBB, 1992).

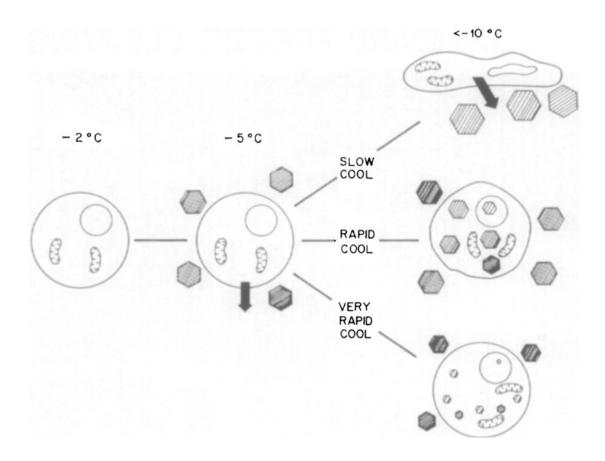


Figura 1.1. Efeito da velocidade do resfriamento na desidratação e formação de cristais de gelo intracelular (MAZUR, 1984). *Slow Cool*: resfriamento lento, *Rapid Cool*: refriamento rápido, *Very Rapid Cool*: resfriamento muito rápido.

Frequentemente, a primeira etapa do resfriamento envolve também o prétratamento com crioprotetores, a qual é seguida pelo resfriamento lento, com taxa de decaimento de temperatura determinada (geralmente entre 0,5-2,0 °C/min), seguida pela rápida imersão das amostras em nitrogênio líquido e armazenamento. O procedimento requer, portanto, um sistema que permita o resfriamento de forma controlada, com a utilização de freezers programáveis. Uma alternativa menos custosa à utilização desses equipamentos é o resfriamenteo das amostras em recipiente contendo álcool isopropílico, pré-resfriado em freezers -60 ou -80 °C, capazes de reduzir a temperatura do material a ser criopreservado em

aproximadamente 1 °C/min (ENGELMANN, 2004; PANIS; LAMBARDI, 2005).

1.1.1.3 Vitrificação

Novas técnicas de criopreservação foram baseadas em procedimentos de vitrificação (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990), utilizando calos de *Citrus sinensis*. As técnicas de vitrificação são operacionalmente menos complexas em relação as clássicas, por não exigir a utilização de freezers programáveis, e por apresentarem potencial de aplicabilidade ampla dentre as espécies vegetais, e assim serem adaptadas para os diferentes tipos de materiais (ENGELMANN, 1997).

Esta metodologia está baseada no tratamento das amostras em meio concentrado de crioprotetores, e/ou da dessecação com ar (ventilação forçada ou ar comprimido), seguido pela imersão direta em nitrogênio líquido. Após a desidratação com os crioprotetores, o material, ao ser mergulhado em nitrogênio líquido, durante a passagem do estado líquido para sólido, atinge o estado vítreo, em temperatura específica (Tg) para cada tipo de material. O estado vítreo é um estado amorfo com mobilidade bastante reduzida, mas como não apresenta a formação da malha cistalina, não é considerado sólido. Por não formar estrutura sólida, o gelo não é formado dentro das células e assim, o material pode ser satisfatoriamente criopreservado (revisto em SAKAI, 2000). O conteúdo em estado vítreo preenche os espaços na célula, contribuindo na prevenção do colapso dos tecidos, e alterações na concentração de solutos e no pH. Além disso, nesta condição ocorre uma pressão de vapor menor, quando comparado com a água em estado cristalino, prevenindo a desidratação das células resfriadas. Em decorrência da altíssima viscosidade, todas as reações químicas que requerem a difusão molecular deixam de ocorrer, permitindo que as células adquiram um estado de dormência e estabilidade ao longo do tempo (BURKE, 1986). Dessa forma, a vitrificação é o único procedimento que evita o congelamento, e permite com que células hidratadas, tecidos e órgãos sobrevivam à temperatura do nitrogênio líquido (revisto em SAKAI, 2000). A transição para o estado vítreo, durante resfriamento e reaquecimento durante a recuperação pode ser registrado usando análise térmica em DSC (Differential Scanning Calorimetry) (NADARAJAN et al., 2008; SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990; VOLK; WALTERS, 2006).

A forma de atuação dos crioprotetores durante os procedimentos de criopreservação é assunto ainda controverso, sendo os procedimentos adaptados, para os diferentes materiais, de maneira empírica. De acordo com a penetração na membrana plasmática, os crioprotetores podem ser classificados como penetrantes e não penetrantes.

Crioprotetores penetrantes são moléculas de baixo peso molecular como glicerol, etileno glicol e dimetilsulfóxido (DMSO), capazes de atravessar a membrana plasmática (DAVIS et al., 2007). Durante a desidratação por congelamento podem ajustar o balanço osmótico, no interior da célula, penetrando pela membrana ao mesmo tempo em que ocorre a saída da água (BENSON et al., 2012). Esta condição permite a desidratação das células de tal maneira que, ao serem resfriadas, atinjam o estado vítreo (BENSON et al., 2012). Estas substâncias são capazes de reduzir a temperatura de congelamento, prevenindo a formação de cristais de gelo dentro da célula, e evitando danos celulares durante o reaquecimento (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008; NASH, 1962). Estudos de criobiologia clássica sugerem que o uso do glicerol, ou outro aditivo crioprotetor, que permeie as membranas substituindo a água perdida é capaz de evitar injúrias causadas pelos efeitos coligativos ou "efeitos de solução" ou, em outras palavras, protege as células dos efeitos nocivos causados pelo contato prolongado das mesmas à altas concentrações de sais (CHEN et al., 1984).

Os crioprotetores não penetrantes são, geralmente, monossacarídeos ou dissacarídeos, como sorbitol, trealose e sacarose. Atuam pela indução da desidratação celular causada pelo aumento da concentração do meio extracelular, em relação às células. Assim, auxiliam na conformação das membranas durante a redução do volume celular, durante a desidratação no resfriamento e na reidratação, durante a recuperação. Nestes casos, a adição desses açúcares tem como objetivo mimetizar o que ocorre naturalmente, nos sistemas vegetais tolerantes à dessecação (revisado por DAVIS et al., 2007).

Na tentativa de obter uma solução de vitrificação cuja proporção entre os crioprotetores utilizados pudessem ser utilizados em diferentes sistemas, a solução de vitrificação PVS2 (*Plant Vitrification Solution 2*) foi formulada (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990). Esta solução permite que o conteúdo celular não congele, mesmo em temperaturas inferiores à -100°C, apresenta baixa toxicidade, e

não permeia o citossol, durante o processo de desidratação (ENGELMANN, 2004). Para a grande maioria dos protocolos objetivando a indução à tolerância para a desidratação antes do tratamento com PVS2, o material deve ser pré-cultivado, em meio com altas concentrações de sacarose, seguido da utilização de uma mistura de glicerol com sacarose (solução de carga). Altos teores de açúcar ou sorbitol, acumulados durante o pré-cultivo aumentam a sobrevivência em diferentes sistemas vegetais, como células e meristemas, além de promover uma maior estabilidade de membranas. Sugere-se que a proteção seria resultado da deposição do açúcar no espaço periprotoplasmático, evitando danos nas membranas contra o estresse mecânico causado pela severa desidratação (SAKAI, 2004).

Para a criopreservação de sistemas vegetais, procedimentos como a desidratação por aeração ou por encapsulamento também são mencionados como vitrificação (ENGELMANN, 1997). O encapsulamento foi desenvolvido e baseado na tecnologia de produção de sementes sintéticas, no qual os materiais vegetais são envolvidos em alginato, após desidratação prévia em meio líquido enriquecido com crioprotetores, ou concomitantemente ao encapsulamento (DEREUDDRE et al., 1991). Estas metodologias têm sido preferencialmente empregadas, para embriões e meristemas.

A dessecação por ar comprimido ou nitrogênio gasoso (*flash drying*) foi uma alternativa desenvolvida para retirar umidade do material de forma mais rápida que a dessecação química, diminuindo a exposição do material à condições estressantes (BERJAK et al., 1990). Em um estudo com eixos embrionários de *Landoiphia kirkii* objetivando-se avaliar a relação entre a taxa de secagem e a resistência à dessecação em DSC (*Differential Scanning calorimetry*), foi verificado que o alcance de uma taxa de desidratação mais rápida era a única estratégia encontrada para a recuperaração os embriões, até então intolerantes à dessecação (PAMMENTER; VERTUCCI; BERJAK, 1991). Atualmente, este procedimento tem sido aplicado a um grande número de embriões e eixos extraídos de sementes recalcitrantes, sendo a sobrevivência obtida para amostras dessecadas em torno de 10 a 20%,com base na massa fresca.

Após o resfriamento e armazenamento, em nitrogênio líquido, o sucesso na recuperação depende da metodologia utilizada para o descongelamento, que deve ser o mais rápido possível, para evitar o fenômeno de recristalização. Caso o

congelamento seja lento, o gelo presente permanecerá em estado termodinamicamente favorável à formação de cristais maiores e, portanto, com maiores possibilidades de danos para as células (MAZUR, 1984). O sucesso da criopreservação somente pode ser avaliado após a recuperação final do material, considerando-se diferentes características como: alterações morfológicas (expansão foliar, formação de calo, desenvolvimento embrionário), regeneração de meristemas e plantas, e o reestabelecimento da produção de metabólitos (BENSON, 1995).

1.1.3 Aspectos fisiológicos e bioquímicos da criopreservação

Ao longo do processo de criopreservação, os materiais são submetidos a diferentes condições de estresse, como osmótico e de desidratação, cuja tolerância depende do sistema vegetal utilizado e das condições fisiológicas e bioquímicas das células que o constituem (HUGHES; DUNN, 1996; WELLING; PALVA, 2006).

O envolvimento das poliaminas (PAs) e do ácido abcisico (ABA), espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteínas na resposta das plantas ao estresse abiótico, como o resfriamento, tem sido sugerido em diferentes estudos (BOUCHEREAU et al., 1999; FORNI et al., 2010; KIM et al., 2002; RAMON et al., 2002; SHEN; NADA; TACHIBANA, 2000; SILVEIRA et al., 2006; TUN et al., 2008).

As principais PAs encontradas nas células vegetais são: a diamina putrescina (Put), a triamina espermidina (Spd) e a tetramina espermina (Spm). Este grupo de substâncias inclui compostos nitrogenados alifáticos, positivamente carregados, em pH fisiológico, ocorrendo na forma livre ou conjugada com ácidos fenólicos e moléculas de baixo peso molecular (BOUCHEREAU et al., 1999). Estas características permitem interação com macromoléculas carregadas negativamente como DNA, RNA, proteínas e fosfolipídeos, participando da regulação das propriedades físicas e químicas das membranas e modulação das atividades enzimáticas (GALSTON; SAWHNEY, 1990). Assim, as PAs participam da regulação de diversos processos biológicos como crescimento (divisão celular), replicação do DNA e diferenciação celular (BARON; STASOLLA, 2008; EVANS; MALMBERG, 1989). A concentração total de PAs e a relação entre as mesmas variam de acordo com a espécie, órgão ou tecido, e estádio de desenvolvimento do vegetal (ASTARITA; HANDRO; FLOH, 2003; BOUCHEREAU et al., 1999; DIAS et al., 2009; SANTA-CATARINA et al., 2006; SILVEIRA et al., 2006).

O ABA, pertencente à classe de metabólitos dos isoprenóides, tem seus níveis endógenos modulados por um preciso balanço entre sua biossíntese e o seu catabolismo (NAMBARA; MARION-POLL, 2005). É um dos hormônios vegetais mais pesquisados na sinalização de fatores bióticos e abóticos, regulando tanto o desenvolvimento quanto os processos adaptativos em plantas (CUTLER et al., 2010; SANTNER; CALDERON-VILLALOBOS; ESTELLE, 2009). Diversos estudos demonstram o envolvimento do ABA na síntese de proteínas de reservas e lipídeos para a promoção da tolerância à dessecação e dormência, inibição da transição entre as etapas de maturação da semente e germinação, e entre o crescimento vegetativo e reprodutivo (LEUNG; GIRAUDAT, 1998; NAMBARA; MARION-POLL, 2005; ROCK; SAKATA; QUATRANO, 2010). O ABA apresenta função central na tolerância ao estresse abiótico em plantas, de forma que os genes induzidos por ele codificam proteínas relacionadas com a tolerância ao estresse, enquanto que os genes reprimidos pelo fitormônio codificam proteinas associadas ao crescimento (CUTLER et al., 2010). Diferentes estudos apontam importância do ABA na aclimatação e tolerância ao congelamento e sua indução pela desidratação em plantas (ALCÁZAR et al., 2006; BRAVO et al., 1998; CATALÁ; MEDINA; SALINAS, 2011; CHENG et al., 2009; CUEVAS et al., 2008; GRIFFITH; HUNER; HAYDEN, 1986; GRIFFITH; YAISH, 2004; GUSTA; TRISCHUK; WEISER, 2005; HON et al., 1995; KUMAR; KAUR; NAYYAR, 2008; LAAMANEN; UOSUKAINEN; HAEGGMAN, 2008; MANTYLA; LANG; PALVA, 1995; NAKAMURA et al., 2008; RAGHAVENDRA et al., 2010; ROWNTREE et al., 2007).

As ROS são moléculas altamente reativas, que atuam na regulação da expressão de genes sensíveis aos sinais *redox* e na alteração da homeostase celular, pela síntese de moléculas fisiologicamente ativas (RIBEIRO et al., 2005). Estas substâncias são capazes de atuar diretamente nas atividades das enzimas e nas propriedades de membrana e estrutura do DNA (CASSELLS; CURRY, 2001; INZÉ; VAN MONTAGU, 1995; KONIECZNY et al., 2008). Em plantas, participam das respostas de estresses ambientais como: temperatura, ultra-violeta, ozônio (DELLEDONNE, 2005; MITTLER et al., 2004; ZAGO et al., 2006) hídrico, salino (BAEK, 2012; VERSLUES et al., 2006) e estresses bióticos como observado durante

a interação planta-patógeno (DELLEDONNE et al., 2001), além de morte celular programada (VAN BREUSEGEM; DAT, 2006). Tais moléculas estão envolvidas em processos de desenvolvimento como a germinação de sementes, gravitropismo, lignificação da parede celular, crescimento e diferenciação das raízes e na embriogênese. Sua atuação nas respostas das plantas aos sinais e estímulos endógenos, como auxinas, ABA e PAs já foi reportada (DESIKAN; HANCOCK; NEILL, 2004; FILIPPOU; ANTONIOU; FOTOPOULOS, 2013; SILVEIRA et al., 2006; STEINER et al., 2007; YAN et al., 2007). Como ressaltado acima, materiais criopreservados estão sujeitos a ao estresse oxidativo, que promovam a oxidação de lipídios, e consequente, dano às membranas celulares (DUMET; BENSON, 2000). Dessa forma, ajustes no sistema antioxidante das células, como o sequestro das moléculas em excesso, são condição importante para evitar os danos ao sistema de membranas destas células (GADEA et al., 2004).

Dentre as proteínas envolvidas no processo de resfriamento, destacam-se as proteínas anti-congelamento (*anti-freezing proteins*) (AFPs) (JARZĄBEK; PUKACKI; NUC, 2009). Esta classe de proteínas foi descrita primeiramente em peixes marinhos polares (DEVRIES; KOMATSU; FEENEY, 1970), e posteriromente em outros organismos, como insetos, bactérias, fungos e plantas (YUAN-ZHEN et al., 2005). Em coníferas (*Picea* spp), foram capazes de proteger enzima sensível ao congelamento (lactato desidrogenase), reduzir a temperatura de congelamento e a propagação dos cristais de gelo no apoplasto das céulas em acículas de coníferas que foram aclimatadas ao frio (JARZĄBEK; PUKACKI; NUC, 2009). Estas proteínas atuariam diretamente nos efeitos do congelamento e descongelamento, por apresentarem múltiplos domínios hidrofóbicos de ligação ao gelo, interagindo diretamente com os cristais, impedindo o seu crescimento na cristalização e recristalização (PIHAKASKI-MAUNSBACH et al., 2003) a partir da formação de uma barreira entre o cristal em crescimento e a superfície de água ainda líquida (JOROV; ZHOROV; YANG, 2004).

As PAs, ABA, ROS e proteínas são reconhecidamente importantes na tolerância ao estresse, pelo resfriamento e desidratação. Entretanto, os estudos que relacionem tais compostos a durante a criopreservação de sistemas com sementes recalcitrantes ainda são muito escassos.

1.1.4 O sistema Araucaria angustifolia

A. angustifolia é uma espécie arbórea da família Araucariaceae, com ocorrência natural nos Estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e São Paulo (CARVALHO, 1994), sendo a única conífera nativa com importância econômica no Brasil. A qualidade da madeira, leve e sem falhas, fez com que a araucária fosse intensamente explorada, principalmente a partir do início do século XX. Calcula-se que entre 1930 e 1990, cerca de 100 milhões de pinheiros tenham sido derrubados. Como decorrência da exploração indiscriminada e sem o reflorestamento das áreas exploradas, ocorreu um esgotamento das reservas naturais, limitando sua utilização comercial (PROCHNOW, 2009).

Atualmente, as reservas com Α. angustifolia estão limitadas aproximadamente 1-2% da sua área original (GUERRA et al., 2002). Esta situação vem sendo agravada pela exploração ilegal da madeira e pela conversão da floresta em áreas agrícolas e reflorestamentos de espécies exóticas como o Pinus, aumentando ainda mais o isolamento dos remanescentes (PROCHNOW, 2009). No estado de São Paulo, está ameaçada de extinção, na categoria "criticamente em perigo" (SEMA-SP, 1998), é considerada pela EMBRAPA para a conservação ex situ (MEDEIROS et al., 1998) e pelo Ministério do Meio Ambiente como prioritária para conservação in situ em Unidades de Conservação (Decreto-Lei nº 4.340, de 22 de agosto de 2002).

O ciclo de vida da *A. angustifolia* é longo, demorando cerca de 15 anos para atingir a maturidade reprodutiva (GARCIA, 2002). A polinização inicia em setembro, e extende-se até dezembro, com o amadurecimento das sementes no período de março a julho. Sua fenologia é irregular, e seu ciclo reprodutivo leva, em geral, em torno de dois a quatro anos, considerando-se o início do desenvolvimento do cone feminino até a dispersão das sementes (MANTOVANI; MORELLATO; DOS REIS, 2006; SHIMOYA, 1962; SOUSA; HATTEMER, 2003). Suas sementes são recalcitrantes e impossibilitam o armazenamento das mesmas por período superior a dois anos, apresentando perda de viabilidade quando o teor hífrico atinge valores abaixo de 70% (FARRANT; PAMMENTER; BERJAK, 1989). Nesse sentido, a conservação de pólen ou o cultivo *in vitro* de suas estruturas vegetativas, são

alternativas de à conservação de suas sementes (WANG; TSUCHIYA; WILSON, 1993).

A macropropagação, e os métodos convencionais de propagação dessa espécie, são dificultados pelo estádio de maturação dos propágulos, seja via estaquia ou enxertia, em função do plagiotropismo e crescimento lateral dos explantes (KAGEYAMA; FERREIRA, 1975; WENDLING, 2011). Assim, outras estratégias como é o caso das técnicas biotecnológicas, devem ser adotadas. Salienta-se que estas metodologias apresentam um grande potencial de aplicação nos programas de melhoramento genético e conservação de germoplasma de *A. angustifolia* (PIERUZZI et al., 2011; STEINER et al., 2008). Dentre as técnicas biotecnológicas, a micropropagação, através da embriogênese somática, é considerada como a mais promissora em plantas, para a clonagem massal de genótipos selecionados (STEINER et al., 2008) bem como para conservação *ex situ* de germoplasma de espécies em risco de extinção (JARDA et al., 2013; JOHNSON; CRUSE-SANDERS; PULLMAN, 2012).

Estudos nesta linha de pesquisa têm sido conduzidos em diferentes grupos de pesquisa no Brasil. O Laboratório de Biologia Celular de Plantas (BIOCEL) do IBUSP, e os grupos associados, vêm utilizando a *A. angustifolia* como modelo para estudos de embriogênese somática e zigótica, sob o ponto de vista básico e aplicado. Neste contexto, experimentos de indução e maturação de células embriogênicas, têm sido realizados objetivando o estabelecimento de um protocolo de propagação eficiente e que permita a produção em larga escala, de embriões e plântulas.

Estudos da conservação de germoplasma *ex situ*,a longo prazo, no sistema *A. angustifolia* são necessários para o desenvolvimento dos programas de conservação (bancos de germoplasma) e recuperação de áreas degradadas da espécie. Até o momento, existe apenas um relato de criopreservação de material vegetal (linhagens celulares embriogênicas) em *A. angustifolia* (Demarchi, 2003). Contudo, ainda não haviam sido feitas observações das alterações fisiológicas, bioquímicas e histológicas, em materiais criopreservados.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi o estudo da criopreservação *de A.* angustifolia nos seus aspectos fisiológicos e bioquímicos.

1.2.2 Objetivos específicos

- a) Estabelecimento de protocolos de criopreservação para o sistema A. angustifolia;
- b) Avaliação das alterações nos conteúdos endógenos de poliaminas, ácido abscísico, e peróxido de hidrogênio e do perfil protéico ao longo do processo de criopreservação das células embriogênicas de *A. angustifolia*;
- c) Avaliação da tolerância à dessecação dos eixos embrionários de A. angustifolia;
- d) Estudos dos aspectos morfo-histológicos nas diferentes etapas do procedimento de criopreservação de embriões zigóticos de *A. angustifolia*.

CAPÍTULO 2 - ASPECTOS BIOQUÍMICOS DO PROCESSO DA CRIOPRESERVAÇÃO EM CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE *A. angustifolia*: POLIAMINAS, ÁCIDO ABCÍSICO E PERFIS PROTÉICO

Resumo: Apesar da reconhecida importância dos crioprotetores nos prétratamentos e tratamentos durante nos protocolos de criopreservação, estudos dos efeitos fisiológicos e bioquímicos destas substâncias nas células vegetais são escassos. O objetivo deste trabalho foi a avaliação de diferentes parâmetros bioquímicos nas células embriogênicas de A. angustifolia durante o processo de criopreservação. O protocolo utilizado foi baseado naquele desenvolvido por Hargreaves (1995) com modificações. Foram, utilizadas combinações dos sorbitol DMSO, associados ao congelamento crioprotetores. е descongelamento rápido. Para o estudo, foi avaliado o efeito dos crioprotetores nas culturas célulares. Em cada etapa do procedimento de criopreservação (prétratamento, tratamento e recuperação), foram avaliados o conteúdo de ácido abscísico (ABA) e espécies reativas de oxigênio (ROS), o padrão de poliaminas (PAs) e proteínas. Os resultados obtidos demonstram que as células que não puderam ser recuperadas (não expostas aos crioprotetores) apresentaram níveis mais altos de PAs, ABA e ROS, em relação às células expostas aos crioprotetores e, portanto, recuperadas com viabilidade, evidenciando uma relação entre aumento e o estresse pelo resfriamento. Duas bandas que foram coradas com maior intensidade, correspondentes a proteínas de baixo peso molecular (20 e 25 kDa) foram identificadas nas células que puderam ser recuperadas (expostas aos crioprotetores). Estas bandas foram relacionadas com uma possível proteção ao congelamento decorrente da ação dos crioprotetores.

2.1 Introdução

Quando um sistema vegetal é submetido ao processo de criopreservação, aspectos fisiológicos, especialmente aqueles relacionados com estresse, devem ser considerados. Dentre os compostos endógenos relacionadas com a resposta ao resfriamento e a aclimatação ao frio, podemos citar as poliaminas (PAs), ácido abscísico (ABA), espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteínas (BAEK, 2012; BOUCHEREAU et al., 1999; MANTYLA; LANG; PALVA, 1995).

O acúmulo de PAs e sua função protetora em situações de estresse tem sido referenciadas em diversos estudos, propondo que quando em condições de desidratação, a sua atuação seja direta na estabilização das membranas e redução na síntese de etileno (BOUCHEREAU et al., 1999). Observou-se que algumas variedades de pepino (*Cucumis sativus*) apresentavam maior resistência à ocorrência de injúrias do que outras. Estudos revelaram que as variedades, cujo conteúdo de espermidina aumentava ao longo do procedimento de resfriamento, apresentaram menor injúria, em relação às variedades que não apresentaram tal aumento (SHEN; NADA; TACHIBANA, 2000). Em batata (*Solanum sp*), um aumento da expressão dos genes relacionadas ao metabolismo das PAs foi descrito quando expostas ao frio (OUFIR et al., 2008). Em *Arabidopsis*, a superexpressão de genes relacionados às poliaminas permitiu aumento da resistência à salinidade, desidratação e ao frio (ALCÁZAR et al., 2006). Em arbóreas, a superexpressão de um gene responsável pela síntese de espermidina foi capaz de aumentar a tolerância à salinidade e ao metal pesado (WEN et al., 2007).

Diferentes estudos demonstraram ocorrer uma elevação dos conteudos de ABA quando as plantas são expostas a condições de baixas temperaturas. Esta situação foi observada para diferentes modelos vegetais como tomate (*Lycopersicum sp*), trigo (*Triticum sp*) e *Arabidopsis thaliana* (CUEVAS et al., 2008; DAIE; CAMPBELL, 1981; ZELLER et al., 2009). Aplicações exógenas de ABA foram capazes de induzir tolerância ao congelamento em alfafa, (MOHAPTRA; POOLE; DHINDSA, 1988), *Arabidopsis* (LANG; HEINO; PALVA, 1989), e em suspensões celulares de milho (XIN; LI, 1992). Em *Arabidopsis*, foi verificado que a exposição ao frio ativou a expressão de genes relacionados à produção de ABA (Zeller *et al.* 2009), enquanto genótipos deficientes para este regulador vegetal apresentaram

baixa tolerância ao congelamento (HEINO et al., 1990). A influência do ABA na tolerância ao resfriamento também pode ser observada em milho, pepino e pimenta (LI; HEW, 1991) e em plantas de arroz capazes de elevar os níveis do hormônio em resposta ao resfriamento (LEE; LUR; CHU, 1993). O pré-tratamento com ABA no processo de aclimatação de plantas de grão-de-bico foi capaz de tornar a membrana plasmática mais insaturada, e reduzir a LT₅₀ (temperatura que induz 50% da morte das células foliares) (BAKHT; BANO; DOMINY, 2006). Estudos sugerem a indução comum de genes e proteínas como resultado do aumento no conteúdo de ABA, redução da temperatura e outros tipos de estresse, tato bióticos quanto abióticos (ÁLVAREZ; CORTIZO; ORDÁS, 2012; CUI et al., 2005; DEGAND et al., 2009; HASHIMOTO; KOMATSU, 2007; LEE; HENDERSON; ZHU, 2005; LEE; CHEN, 1993; URANO et al., 2009).

Em várias espécies vegetais, a tolerância ao congelamento varia com o órgão considerado, sendo o processo de aclimatação é associado às mudanças bioquímicas e fisiológicas nos tecidos das plantas (HUGHES; DUNN, 1996; WELLING; PALVA, 2006) incluindo a síntese de proteínas anti-congelamento (AFPs) 2009). (JARZABEK; PUKACKI; NUC, **Plantas** de tabaco transgênicas superexpressando uma proteína de membrana induzida pelo frio, foi capaz de aumentar a resistência de variedade com baixa tolerância ao frio (FENG et al., 2009). Proteínas relacionadas com estabilização de estruturas, além de proteólise e estresse, puderam ser identificadas em raízes de chicória (Cichorium intybus) quando submetidas a períodos de aclimatação de temperaturas baixas, mas não abaixo de zero (DEGAND et al., 2009). Além das proteínas relacionadas à estabilização de membranas, lipoproteínas e ERD14 (early response to dehydration protein 14) foram identificadas em maiores quantidades durante a aclimatação ao frio. Acredita-se que estas últimas atuem no sentido de propiciar a extrusão de água substituindo as vesículas endocíticas durante a concentração osmótica induzida por congelamento (VOLK, 2010).

Um dos efeitos da criopreservação é o estresse oxidativo, que altera o metabolismo através da produção de radicais livres, resultando na oxidação de lipídios, e consequente dano às membranas celulares (DUMET; BENSON, 2000). Durante esse tipo de estresse, espécies reativas de oxigênio (ROS) e de óxido nítrico (NO), podem ser destacadas. A adição exógena de espermidina (Spd) e

espermina (Spm) foi relacionada com a indução da biossíntese e a rápida liberação de NO, crescimento e diferenciação, em culturas embriogênicas de *A. angustifolia* (SILVEIRA et al., 2006). Diferentes tipos de estresses, bióticos e abióticos, em que as poliaminas estariam envolvidas, promoveriam a produção o NO, que por ser facilmente difusível, atuaria como mediador nas respostas dos vários sistemas vegetais (SCHERER, 2007). Estresses bióticos e abióticos frequentemente requerem a sinalização tanto de ABA como de NO. Entretanto, os seus papéis precisam ser esclarecidos, e os eventos que são desencadeados, após sua sinalização, demonstrados (HANCOCK; NEIL; WILSON, 2010).

Diferentes genes relacionados ao estresse e à biossíntese de moléculas protetoras contra a desidratação, como acúcares e proteínas LEA (*Late embryogenesis abundant*), são induzidos por ABA, protegendo a planta contra danos causado por estresse e promovendo um aumento na sua tolerância (LEE; HENDERSON; ZHU, 2005; URANO et al., 2009; YE; JIA; ZHANG, 2012). Diversos trabalhos sustentam a hipótese de que o ABA esteja envolvido na tolerância às baixas temperaturas. Níveis elevados de ABA foram observados em plantas expostas a baixas temperaturas, as quais não causam congelamento (CUEVAS et al., 2008; DAIE; CAMPBELL, 1981; LALK; DORFFING, 1985). Aplicações exógenas de ABA induziram tolerância ao congelamento em alfafa, (MOHAPTRA; POOLE; DHINDSA, 1988), *Arabidopsis* (LANG; HEINO; PALVA, 1989), e em suspensões celulares de milho (XIN; LI, 1992). Por outro lado, uma baixa tolerância ao congelamento foi registrada em genótipos de *Arabidopsis*, deficientes em ABA (HEINO et al., 1990).

Além das proteínas LEA, podem ser citadas as (AFPs) (anti-freezing proteins) que são mais diretamente relacionadas com a proteção ao congelamento (JARZĄBEK; PUKACKI; NUC, 2009). Esta classe de proteínas foi descrita primeiramente em peixes marinhos polares (DEVRIES; KOMATSU; FEENEY, 1970), e posteriromente em outros organismos, como insetos, bactérias, fungos e plantas (YUAN-ZHEN et al., 2005). A estrutura das proteínas AFPs revela estreita semelhança com proteínas relacionadas à patogênese. Quitinases, glucanases e taumatinas são produzidas em plantas de centeio adaptadas ao inverno, quando submetidas à baixas temperaturas ou à seca (HON et al., 1995; YU; GRIFFITH, 2001), ou quando submetidas à ABA, ácido salicílico ou injúria mecânica

(HIILOVAARA-TEIJO et al., 1999). Estas proteínas atuariam diretamente nos efeitos do congelamento e descongelamento, por apresentarem múltiplos domínios hidrofóbicos de ligação ao gelo, interagindo diretamente com os cristais, impedindo seu crescimento na cristalização e recristalização (PIHAKASKI-MAUNSBACH et al., 2003), não sendo diretamente relacionada às membranas (GRIFFITH; YAISH, 2004). Além disso, são capazes de reduzir a temperatura de congelamento e a propagação dos cristais no apoplasto (JARZĄBEK; PUKACKI; NUC, 2009). Entretanto, a forma com que atuam varia, e sua regulação são distintas, evidenciando que tais proteínas sejam produzidas por diferentes membros de famílias gênicas (GRIFFITH; YAISH, 2004).

Relatos do envolvimento de PAs, ROS, ABA e proteínas simultaneamente ao longo do procedimento de criopreservação em plantas são escassos. Um protocolo de criopreservação de células embriogênicas de A. Angustifolia foi desenvolvido, desenvolvido embriões Р. baseado naquele para zigóticos de (HARGREAVES et al., 1995) e apresentado no APÊNDICE. Verificou-se que apenas as células que receberam criprotetores, durante o pré-tratamento e tratamento, puderam ser criopreservadas. Dentre os tratamentos, apenas quando utilizado 20% de DMSO resultou em células viáveis, ou seja, capazes de se multiplicar e de atingir massa semelhante ao controle, ao final de seis semanas, após reaquecimento. As células não tratadas com crioprotetores não apresentaram aumento de massa após o reaquecimento.

O objetivo do presente capítulo foi estudar o efeito dos crioprotetores em diferentes parâmetros bioquímicos como conteúdo e perfil de PAs, ROS, ABA e perfil proteico ao longo do procedimento de criopreservação.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Material vegetal

Embriões zigóticos imaturos e maduros foram isolados de cones provenientes de populações naturais de *A. angustifolia* do município de Canoinhas, no estado de Santa Catarina, entre os meses de janeiro e junho de 2009.

2.2.2 Metodologias

2.2.2.1 Indução das culturas embriogênicas

Sementes imaturas de *A. angustifolia* foram imersas por 5 minutos em 70% (v/v) de álcool etílico e em seguida por 25 min. em solução 50% (v/v) de hipoclorito de sódio (2-2,5% (p/v) de cloro ativo). Após três lavagens com água destilada autoclavada, as sementes foram abertas dentro da câmara de fluxo laminar, e os embriões zigóticos imaturos isolados.

Os embriões zigóticos imaturos, utilizados como explantes iniciais foram inoculados em meio de cultura MSG (BECWAR; WANN; JOHNSON, 1987) previamente distribuído em placas de Petri (49 x 13 mm). Foram utilizados quatro explantes por placa de cultivo. As culturas foram mantidas por 45 dias, no escuro, à temperatura de 25 ± 2 °C, período em que os explantes apresentavam proliferações celulares brancos foram utilizadas.

As culturas embriogênicas induzidas foram mantidas em ciclos de proliferação celular no escuro a temperatura de 25 ± 2 °C, em meio de cultura semi-sólido, por um período de 21 dias entre as repicagens.

2.2.2.2 Metodologia de criopreservação

A metodologia utilizada, para a criopreservação das culturas embriogênicas foi baseado naquela descrita para criopreservação de células embriogênicas de *Pinus* (HARGREAVES et al., 1995). A figura 2.1 apresenta o esquema utilizado no processo de criopreserção e o detalhamento está descrito nos próximos itens.

2.2.2.2.1 Pré-cultivo e congelamento

As suspensões celulares foram obtidas utilizando-se um grama de células embriogênicas, inoculadas em uma placa de cultura contendo seis poços, contendo 3 ml de MSG (BECWAR; WANN; JOHNSON, 1987) líquido suplementado com 0,4 M de sorbitol, pré-condicionados em gelo por 15 minutos. O material foi mantido em agitadores rotativos (25 RPM de agitação), por 24 horas, no escuro à temperatura de

25 °C. A seguir transferidos para um recipiente contendo gelo, onde foram mantidos por 15 minutos. Após este período, em cada poço foi adicionado 3 ml de MSG contendo 0,4 M de sorbitol e DMSO (20% (v/v)), previamente resfriada em gelo por 15 minutos, totalizando um volume total de 6 ml. As placas foram então, novamente mantidas por mais 15 minutos no gelo. Todo o procedimento foi realizado protegendo as células da luz, com as placas cobertas com papel alumínio.

Alíquotas de 1 ml das suspensões celulares foram dispensadas em criotubos de 1,8 ml, transferidas para um recipiente de congelamento NalgeneTM Cryo -1 °C, e acondicionadas em freezer - 80°C durante 2 horas, permitindo resfriamento lento a um a taxa de - 1 °C/min. Após este período, as amostras mergulhadas e estocadas em nitrogênio líquido (-196 °C) por 48 horas antes da recuperação.

2.2.2.2 Descongelamento e recuperação

Após 48 horas em nitrogênio líquido, os criotubos, contendo as suspensões celulares congeladas, foram transferidos para um banho de água com temperatura de 42 °C, por 4-6 minutos, para um rápido descongelamento. O conteúdo dos criotubos foi colocado em papel de filtro, previamente autoclavado, e a solução removida, utilizando filtragem à vácuo. O papel de filtro contendo as culturas embriogênicas foi transferido para a uma placa de Petri, contendo meio MSG semisólido livre de crioprotetores, e após 24 horas temperatura de 25 °C, no escuro, o papel com as células foi transferido para uma nova placa de Petri com meio MSG. Semanalmente, o material foi transferido, em mesmo meio de cultra e nas mesmas condições de cultivo.

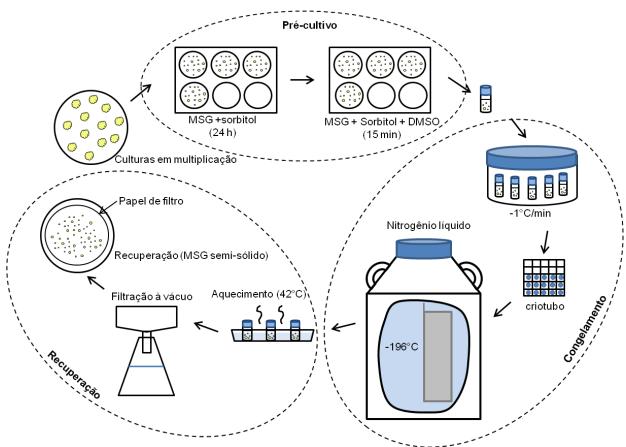


Figura 2.1. Metodologia convencional, com congelamento lento, de criopreservação de culturas embriogênicas de *A. angustifolia*, destacando-se pré-cultivo, congelamento, descongelamento e recuperação.

2.2.2.3 Análises bioquímicas

2.2.2.3.1 Material vegetal

Para as análises de PAs, ABA, ROS e proteínas, amostras de células embriogênicas de *A. angstifolia* foram coletadas em diferentes etapas de criopreservação, conforme esquematizado na Fig. 2.2. Assim, foram utilizados os seguintes amostras de materiais:

a) culturas embriogênicas frescas, ou seja, recém coletadas, após sete dias do ciclo de repicagem em meio de multiplicação, não submetidas a qualquer tratamento de criopreservação;

- b) culturas embriogênicas submetidas ao procedimento de criopreservação, na ausência de crioprotetores e que, portanto, não puderam ser criopreservadas, nas seguintes etapas:
 - A: após pré-tratamento parcial (24 horas em meio MSG);
 - B: após tratamento (24horas em meio MSG seguido de 15 minutos em gelo);
 - C: imediatamente após a recuperação (24 horas em meio MSG, seguido de
 15 minutos em gelo, congelamento e descongelamento);
- c) culturas embriogênicas submetidas ao procedimento de criopreservação, na presença de crioprotetores (0,4 M de sorbitol com 20% de DMSO) e com capacidade recuperação em massa semelhante ao controle não criopreservado, indicado como o mais promissor protocolo de criopreservação das células de *A. angustifolia*, detalhado no **CAPÍTULO 2** deste trabalho:
 - A': após pré-tratamento parcial (24 horas em meio MSG contendo sorbitol);
- B': após tratamento total (24 horas em meio MSG contendo sorbitol seguido de 15 minutos em meio de cultura contendo sorbitol e DMSO em gelo);
- C': imediatamente após descongelamento (24 horas em meio MSG contendo sorbitol, seguido de 15 minutos em meio de cultura contendo sorbitol e DMSO em gelo, congelamento e reaquecimento).

Os tratamentos utilizados e as amostras utilizadas para as determinações bioquímicas estão: esquematizados na figura 2.2.

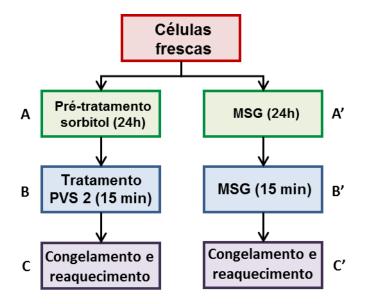


Figura 2.2. Esquema das amostras utilizadas para as análises bioquimicas: células embriogênicas frescas (recém coletadas do meio de multiplicação após 7 dias de repicagem) (controle) e ao logo do processo de criopreservação: **A**: 24 h em meio MSG; **B**: 24 h em meio MSG seguido de 15 min em gelo; **C**: 24 h em meio MSG, seguido de 15 min em gelo, congelamento e reaquecimento; **A**': 24 h em meio MSG contendo sorbitol; **B**': 24 h em meio MSG contendo sorbitol e DMSO em gelo; **C**': 24 h em meio MSG contendo sorbitol, seguido de 15 min em meio de cultura acrescido de sorbitol e DMSO, em gelo, congelamento e reaquecimento.

2.2.2.3.2 Padrão e conteúdo de PAs

A metodologia para a determinação do padrão e conteúdo de PAs livres foi baseada naquela descrita por (SILVEIRA et al., 2004). Amostras de 200 mg de massa fresca, dos diferentes tratamentos , previamente trituradas em nitrogênio líquido, receberam 1,6 ml de ácido perclórico 5% (v/v), vortexadas e mantidas no gelo por 1 hora. Posteriormente, foram centrifugadas a 20.000 g por 20 minutos, a 4 °C, recolhendo-se o sobrenadante.

As PAs foram então derivatizadas, misturando-se 40 μL da amostra contendo PAs, 100 μL de cloreto de dansil (5 mg.ml⁻¹ em acetona), 50 μL de solução saturada de carbonato de sódio (NaHCO₃) e 20 μL de 1,7-diaminoheptano (DAH), utilizado como padrão interno. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas no escuro por 50 minutos, a 70 °C. O excesso de cloreto de dansil foi convertido em dansil-prolina adicionando-se 25 μL de prolina (100 mg.ml⁻¹) com posterior incubação por 30 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Em seguida, as PAs derivatizadas foram particionadas com 200 μL de tolueno, e a fase apolar (tolueno),

que contém as PAs, foi coletada (175 µL), seca sob jato de nitrogênio, e ressuspendida em 175 µL de acetonitrila.

A identificação e quantificação das PAs foram realizadas utilizando-se HPLC, com coluna C18 de fase reversa (Shimadzu Shim-pack CLC ODS). Acetonitrila absoluta e acetonitrila 10% em água (pH 3,5 ajustado com HCl 1N) foram utilizadas como solventes. A mudança na proporção de acetonitrila absoluta em relação à acetonitrila 10% definiu o gradiente de corrida. O gradiente de acetonitrila absoluta foi programado para 65%, durante os primeiros 11 minutos, de 65 a 100% entre 11 e 25 minutos, e 100% até 35 minutos com fluxo de 1 ml.min⁻¹, a 40 °C. O detector de fluorescência foi ajustado para excitação de 340 nm e emissão de 510 nm. Foram injetados 20 μL da amostra derivatizada com cloreto de dansil. As áreas e tempos de retenção de cada PA foram avaliados por comparação com as PAs com concentrações conhecidas: Put, Spd, Spm e DAH. Os resultados foram ajustados com base na massa seca de cada amostra, obtidos a partir da desidratação de alíquotas das mesmas em estufa por à 90 °C por 48 horas.

2.2.2.3.3 Conteúdo de ABA

A metodologia para a extração e dosagem de ABA foi baseada naquela descrita por (SILVEIRA et al., 2004). Amostras de 1g de massa fresca foram maceradas com tampão de extração (etanol 80% + 1% polivinipirolidona-40) e o [³H]ABA radioativos foram utilizados como padrão interno para a determinação do rendimento do processo. O extrato foi agitado por 1 hora e 30 min, no escuro a 4 °C, e centrifugado a 14000 g por 15 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi concentrado em *speed vac* a 45 °C, até atingir 20% do volume inicial (≤ 1,0 ml). O volume da amostra foi ajustado para 3 ml (p/v) com água tipo MilliQ, e o pH foi ajustado para 2,5 com a adição de HCl (1N). As amostras foram particionadas duas vezes, usando-se éter etílico como solvente orgânico. A fase orgânica, contendo o ABA, foi coletada e seca em *speed vac*, a 45 °C. Em seguida, as amostras foram ressuspendidas em 200 μL de metanol 100% e transferidas para tubos do tipo eppendorf e armazenadas a -80 °C, para análises posteriores em HPLC.

A quantificação do ABA foi realizada por HPLC em fase reversa, com coluna C18 (Shimadzu Shim-pack CLC ODS). Foram utilizados como solventes, metanol

100% e uma solução de água-metanol 10% e ácido acético 0,5%. A mudança na proporção de metanol em relação ao outro solvente definiu o gradiente de corrida, sendo o gradiente de metanol 100% ajustado para aumentar de 20% a 30% durante os primeiros 10 minutos, de 30 a 45% entre 10 e 22 minutos, de 45 a 54% entre 22 e 33 minutos, de 54 a 100% entre 33 e 34 minutos e 100% até 60 minutos, com fluxo de 1 ml.min-1, a 40 °C. Para a detecção do ABA, o detector de UV foi ajustado em 254 nm. Foram injetados 40 μL de cada amostra. Frações contendo ABA foram coletadas e analisadas por cintilação líquida (Packard® Tri-carb 2100 TR, USA) para a estimativa de perdas. As áreas e tempos de retenção do ABA foram avaliadas por comparação com concentrações conhecidas destes hormônios.

2.2.2.3.4 Conteúdo de ROS

A produção intracelular de ROS foi determinada por fluorometria (LAXALT et al., 2007). Alíquotas contendo 99 μL de solução com 6 mg de células foram incubadas com H₂DCFDA (diclorofluoresceína diacetato) 1 μM por 30 minutos. A seguir, leituras em fluorímetro, com excitação de 480 nm e emissão de 525 nm (Victor 3TM, PerkinElmer) foram realizadas a cada 10 minutos, até 90 minutos, momento em que a emissão da fluorescência já havia se estabilizado. Os resultados foram obtidos a partir de estimativa da produção de ROS, obtida pela leitura da fluorescência relativa emitida pela oxidação da H₂DCFDA.

2.2.2.3.5 Perfil protéico

As proteínas das células embriogênicas frescas e durante as diferentes etapas de criopreservação foram extraídas, quantificadas e a seguir, separadas por SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis).

A extração foi realizada de acordo com LEHNER; NIEHOF; BORLAK, (2003), modificado. Amostras de 1 grama de massa fresca foram trituradas em nitrogênio líquido. Tampão de extração contendo 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM de PMSF (fenilmetilsulfonil fluorido) e 1mM de EDTA foram adicionados às amostras. A seguir, as mesmas foram agitadas em vortex e mantidas por 30 minutos em câmara fria à 4 °C e vortexadas novamente a cada 15 minutos. Após, foram centrifugadas (14.000)

rpm, 4 °C) e o sobrenadante, contendo as proteínas, coletado, imediatamente congelado e mantido à -20 °C até a utilização. As proteínas totais foram quantificadas pelo método de (BRADFORD, 1976), utilizando BSA como padrão. O perfil das proteínas foi obtido em amostras contendo 8 μg de proteínas através de SDS-PAGE e coradas em Comassie Coloidal, de acordo com (NEUHOFF et al., 1990). Os resultados foram avaliados considerando-se presença e intensidade das bandas reveladas.

2.2.2.4 Amostragem e análise estatística

As análises foram realizadas em triplicatas. O desvio padrão foi utilizado como medida de dispersão estatística.

2.3 Resultados e discussão

No presente trabalho, os mais altos conteúdos de Put, Spm e Spd foram observados imediatamente após a exposição ao gelo, nos materiais sem tratamento com os crioprotetores (B). Na presença de crioprotetores, ocorreu um aumento de Spd e Spm, ao longo das várias etapas de criopreservação (A', B' e C'). Entretanto, não foram observadas alterações no conteúdo de Put, entre as etapas A' e B', que foi seguido de estabilização entre B' e C'. Avaliando-se a soma das PAs identificadas, observa-se um pico em B e, uma tendência ao aumento ao longo das etapas, quando adicionados os crioprotetores (Fig. 2.3.).

Em células de plantas as variações dos padrões e conteúdos endógenos de PAs, quando o material é submetido ao resfriamento, são dependentes da espécie não tendo sido completamente elucidada (FORNI et al., 2010). Em ápices de maçã (*Malus domestica*), após a etapa de desidratação, apresentaram uma redução no conteúdo de Spd e Put, enquanto o conteúdo de Spm permaneceu inalterado. RAMON et al. (2002), utilizando meristemas de três diferentes cultivares de banana (*Musa* spp.), verificaram uma relação entre os níveis de Put e a resistência ao estresse por resfriamento. Neste trabalho, os autores demonstraram que o prétratamento dos materiais, por duas semanas em meio de cultura contendo 0,4 M de sacarose, como um pré-tratamento para a criopreservação, resultou em um aumento

no conteúdo das PAs, principalmente da Put. Além disso, um aumento no conteúdo de ácidos graxos totais também foi reportado. Segundo os autores, a Put estaria relacionada com o aumento nos níveis de instauração dos lipídios de membrana após o pré-tratamento com sacarose, e consequentemente, com a sobrevivência após a criopreservação. Aumento nos conteúdos de Put e Spd foram observados em plantas de pepino (*Cucumis sativus*) submetidas ao frio, sendo apenas Spd relacionada diretamente a uma proteção contra injúrias causadas pelo resfriamento (SHEN; NADA; TACHIBANA, 2000). Em plantas de mostarda (*Tellungiella sp*), o decréscimo de Sdp foi relacionado à tolerância ao congelamento (LEE et al., 2012). Uma redução no conteúdo de PAs foi observada antes do resfriamento e durante a recuperação de células embriogênicas criopreservadas de *P. abies*, após o tratamento com sorbitol e DMSO e foi condição considerada determinante para o sucesso do procedimento (VONDRÁKOVÁ; CVIKROVÁ, 2010).

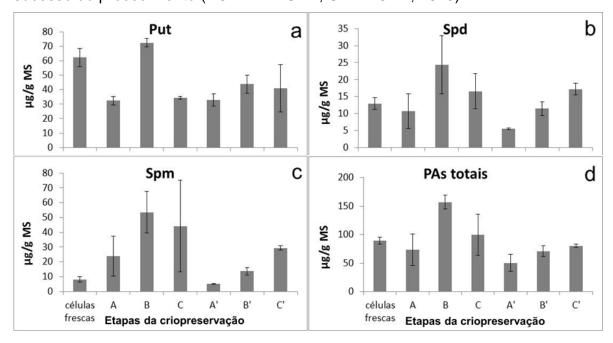


Figura 2.3. Poliaminas (PAs) livres (μg/g de MS + DV): Put (a), Spd (b), Spm (c) e totais (d) nas células embriogênicas frescas (recém coletadas do meio de multiplicação após 7 dias de repicagem) de *A. angustifolia* e ao longo do processo de criopreservação: **A**: 24 h em meio MSG; **B**: 24 h em meio MSG seguido de 15 min em gelo; **C**: 24 h em meio MSG, seguido de 15 min em gelo, congelamento e reaquecimento; **A**': 24 h em meio MSG contendo sorbitol; **B**': 24 h em meio MSG contendo sorbitol e DMSO em gelo; **C**': 24 h em meio MSG contendo sorbitol e cultura contendo sorbitol e DMSO em gelo; **C**': 24 h em meio MSG contendo sorbitol e cultura acrescido de sorbitol e DMSO, em gelo, congelamento e reaquecimento. MS: massa seca, DV: desvio padrão.

No presente trabalho, o pico de PAs observado durante a etapa B, seguida de seu decréscimo poderia ser considerado como um marcador de estresse durante o procedimento de criopreservação para as células de *A. angustifolia*, sendo a recuperação com sucesso das células associada a um aumento gradual de PAs ao longo do protocolo de criopreservação. Salienta-se que, neste caso, o aumento de Put, precursor na via de biossíntese das PAs, poderia também ser responsável pelo aumento observado nos níveis de Spm e Spd em B.

Embora um aumento de Put tenha sido associado com um efeito deletério do resfriamento para as culturas celulares de *A. angustifolia*, o aumento de Spm e Spd, em relação às células frescas, podem ser associadas ao sucesso no protocolo de criopreservação, diferentemente do observado para outros sistemas vegetais. O acúmulo de Put em resposta ao estresse causado pelo frio parece ser essencial para promover a aclimatação ao mesmo. De acordo com os autores acima, mutantes de *Arabidopsis* deficientes para a biossíntese desta PA apresentaram redução na tolerância ao congelamento e na expressão do gene NCED3 (*Nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase*), o qual está envolvido na biossíntese de ABA. A aplicação exógena de Put para os mutantes de ABA, e de ABA para os mutantes de Put restabeleceram as característica selvagem de resistência ao frio (CUEVAS et al., 2008).

Para as células embriogênicas de *A. angustifolia*, observou-se que o conteúdo de ABA das células frescas foi o mais baixo, em relação aos tratamentos realizados. O maior conteúdo de ABA ocorreu na ausência de crioprotetores, após o tratamento com gelo. Na presença dos crioprotetores, o conteúdo de ABA foi crescente ao longo das etapas A', B' e C' (Fig. 2.4.). Ressalta-se que o padrão de variação observado para o ABA foi similar aquele verificado para a Spd e Spm (Fig. 2.3.). Esta situação sugere que a presença dos crioprotetores atue na redução do estresse causado para as células.

Assim como observado para as células de *A. angustifolia*, diferentes trabalhos sustentam a hipótese de que o ABA esteja envolvido na tolerância às baixas temperaturas. Níveis elevados de ABA foram observados em plantas expostas a temperaturas baixas, mas não abaixo de zero (CUEVAS et al., 2008; DAIE; CAMPBELL, 1981). Aplicações exógenas de ABA induziram tolerância ao congelamento em alfafa (MOHAPTRA; POOLE; DHINDSA, 1988), *Arabidopsis* (LANG; HEINO; PALVA, 1989), e suspensões celulares de milho (XIN; LI, 1992). A adição de ABA ao meio de maturação de embriões somáticos de *P. abies*, associada

ao tratamento com aclimatação ao frio, permitiu a criopreservação dos embriões sem a necessidade de pré-tratamento com crioprotetores (KONG; PATRICK VON, 2011). Uma baixa tolerância ao congelamento foi registrada em genótipos de *Arabidopsis*, deficientes em ABA (HEINO et al., 1990) e em variedades de arroz que não apresentaram aumento nos níveis deste hormônio em resposta ao resfriamento (LEE; LUR; CHU, 1993).

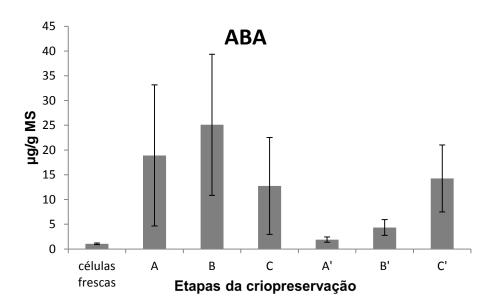


Figura 2.4. Conteúdo de ABA (μg/g de MS + DV) nas células embriogênicas frescas (recém coletadas do meio de multiplicação após 7 dias de repicagem, controle) e ao longo do procedimento de criopreservação: **A**: 24 h em meio MSG; **B**: 24 h em meio MSG seguido de 15 min em gelo; **C**: 24 h em meio MSG, seguido de 15 min em gelo, congelamento e descongelamento; **A**': 24 h em meio MSG contendo sorbitol; **B**': 24 h em meio MSG contendo sorbitol, seguido de 15 min em meio de cultura contendo sorbitol e DMSO em gelo; **C**': 24 h em meio MSG contendo sorbitol, seguido de 15 min em meio de cultura acrescido de sorbitol e DMSO, em gelo, congelamento e descongelamento. Put: putrescina, Spd: espermidina, Spm: espermina, MS: massa seca, DV: desvio padrão.

Diferentes estudos sugerem que a transdução do sinal decorrente do frio seja feita por etapas comuns à outras sinalizações, e que seriam decorrentes de outros estresses abióticos, bióticos ou ABA (LEE; HENDERSON; ZHU, 2005; ZELLER et al., 2009). O estresse provocado pelo abaixamento de temperatura ativaria o ABA que, por sua vez, ativaria a síntese de proteínas (PELAH et al., 1997) e solutos osmoticamente ativos (NIEVES et al., 2001), protegendo as células. Em plantas de grão-de-bico (*C. arietinum*), o pré-tratamento com ABA foi capaz de tornar a membrana plasmática mais insaturada e reduzir a LT₅₀ (temperatura que induz 50% da morte das células foliares) (BAKHT; BANO; DOMINY, 2006).

Baixa tolerância ao congelamento foi registrada em genótipos de *Arabidopsis* deficientes em ABA (HEINO et al., 1990). O tratamento com o hormônio durante a etapa de desidratação permitiu uma maior sobrevivência dos embriões somáticos de *P. abies* criopreservados (HAZUBSKA-PRZYBYŁ et al., 2013). Vários estudos apontam que, em situações de aumento dos níveis de ABA e redução de temperatura, ocorre uma indução comum de genes (LEE; HENDERSON; ZHU, 2005; LEE; CHEN, 1993; URANO et al., 2009) e proteínas (CUI et al., 2005; DEGAND et al., 2009; HASHIMOTO; KOMATSU, 2007). É possível que o aumento nos níveis de PAs, seguido do aumento ABA, verificado no presente trabalho, estejam correlacionados. Nesse sentido, um aumento no conteúdo de Put promoveria a síntese de ABA, possibilitando a sobrevivência das células após o reaquecimento durante o protocolo de criopreservação para as células de *A. angustifolia*. Esta observação corrobora a proposta de que o aumento de Put atuaria diretamente na biossíntese de ABA, o qual reconhecidamente é responsável pela aclimatação das plantas ao frio (ALCÁZAR et al., 2011).

As condições de estresses também têm sido relacionadas com outras moléculas sinalizadoras como é o caso das ROS. Em condições de estresse oxidativo, as ROS podem causar danos no DNA, membrana plasmática e proteínas, resultando na morte celular (BELIGNI; LAMATTINA, 1999; RIBEIRO et al., 2005). No presente trabalho, a presença de níveis mais elevados de ROS, na ausência de crioprotetores, assim como observado para os conteúdos de Put e ABA, poderia estar associados às injúrias nas células embriogênicas de *A. angustifolia*. Danos no DNA de células animais foram identificados após criopreservação e associados com o aumento da liberação de ROS (THOMSON et al., 2009). Nos sistemas vegetais, diferentes estudos têm demonstrado associação entre ABA e ROS, de forma que a adição do hormônio ao meio de cultura teria promovido o aumento de ROS em células de *Arbidopsis* e *Vicia* sp. (PEI et al., 2000; ZHANG et al., 2001).

O conteúdo intracelular de ROS, durante os diferentes tratamentos das células embriogênicas de *A. angustifolia*, pode ser observado na Fig. 2.5. Na ausência de crioprotetores, as células apresentaram níveis de ROS mais elevados em relação aos materiais expostos aos crioprotetores. Os maiores valores de ROS foram observados no tratamento C, ou seja, onde as células foram reaquecidas após o congelamento.

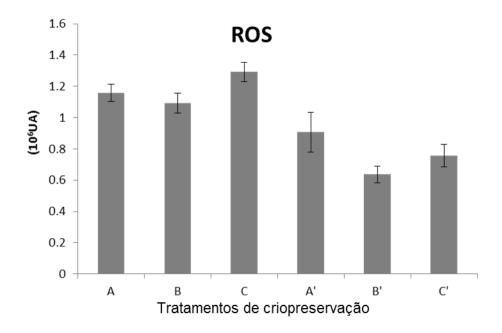


Figura 2.5 Conteúdo de ROS (10⁶UA + DV) nas células embriogênicas de *A. angustifolia* durante o procedimento de criopreservação. **A**: 24 h em meio MSG; **B**: 24 h em meio MSG seguido de 15 min em gelo; **C**: 24 h em meio MSG, seguido de 15 min, em gelo, congelamento e descongelamento; **A**': 24 h em meio MSG contendo sorbitol; **B**': 24 h em meio MSG contendo sorbitol seguido de 15 min em meio de cultura contendo sorbitol e DMSO, em gelo. UA: unidades de absorbância, DV: desvio padrão.

Os resultados apresentados no presente trabalho demonstraram que os crioprotetores reduziram o conteúdo de ROS no material criopreservado. O estresse causado pelo frio é capaz de provocar um acúmulo de peróxido de hidrogênio nas células, assim como aumentar a quantidade de transcritos, proteínas e a atividade de enzimas sequestradoras de ROS (SUZUKI; MITTLER, 2005). Ressalta-se, entretanto, que valores mais elevados destes compostos, para as células de *A. angustifolia*, ocorreram logo após o reaquecimento.

A Fig. 2.6 apresenta o perfil protéico obtido para as células embriogênicas de *A. angustifolia,* nos diferentes tratamentos utilizados. Não foram observadas bandas exclusivas nos vários tratamentos, entretanto, duas bandas entre 21,5 e 30 kDa mostraram-se mais intensamente coradas, nos materiais expostos aos crioprotetores. A banda de maior peso molecular foi identificada nas etapas de prétratamento com sorbitol e no tratamento com sorbitol e DMSO (B' e C'), e a banda de menor peso molecular evidenciada após o reaquecimento (C'). Polipeptídeos com peso molecular semelhantes aos observados no presente trabalho foram identificados no apoplasto de folha de cevada (*Secale cereale*) submetidas ao

congelamento com pré-tratamento de aclimatação ao frio (HON et al., 1995). De acordo com os autores, tais polipeptídeos com atividade anti-congelante, identificados como quitinases e glucanases, foram produzidos apenas pelas plantas que se mostraram tolerantes ao congelamento. Paralelamente, a fotomicrografia dos cristais de gelo formados durante o congelamento após diferentes períodos de aclimatação evidenciaram que, quanto mais longo o período de aclimatação, menores eram os cristais de gelo formados.

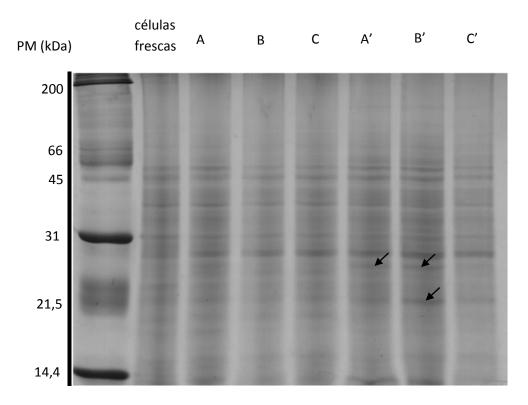


Figura 2.6 Perfil protéico (SDS-PAGE) das células embriogênicas de *A. angustifolia* frescas (recém coletadas do meio de multiplicação após 7 dias de repicagem) e durante as etapas de criopreservação. **A**: 24 h em meio MSG; **B**: 24 h em meio MSG seguido de 15 min, em gelo; **C**: 24 h em meio MSG, seguido de 15 min em gelo, congelamento e descongelamento; **A**': 24 h em meio MSG contendo sorbitol; **B**': 24 h em meio MSG contendo sorbitol, seguido de 15 min em meio de cultura contendo sorbitol e DMSO, em gelo. PM: peso molecular.

Em altas concentrações, as AFPs são capazes de reduzir a temperatura de fusão do material (DEVRIES, 1986), propriedade importante para reduzir a temperatura de congelamento e estratégia utilizada por peixes quando expostos ao gelo para evitar o seu congelamento (DEVRIES, 1988). As AFPs em baixas concentrações, durante o reaquecimento de material congelado, impedem o crescimento dos cristais de gelo (KNIGHT; HALLETT; DEVRIES, 1988), adsorção ao gelo, e protegem enzimas e membranas de células submetidas à criopreservação

(IRIMIA; KARLSSON, 2002; MCGANN, 1979; MERYMAN, 1982). Em sementes de trigo (*Triticum vulgaris*), o tratamento com AFPs permitiu a proteção de meristemas e calos, contra os danos durante a redução de temperatura. Entretanto, sua ação é mais efetiva quando adicionada às soluções crioprotetoras do que quando aplicada de maneira isolada no material a ser criopreservado (REINHOUD; IREN; KIJNE, 2000).

As AFPs apresentam forma e função semelhantes às proteínas produzidas após o ataque de patógenos em plantas (HON et al., 1995). A superexpressão do pathogenesis-related gene 10a, cuja produção é estimulada com defesa a este tipo de ataque em plantas, provocou aumento da tolerância osmótica em culturas celulares de batatas (*S. tuberosum*), quando submetidas à crioproteção durante o pré-tratamento, anterior ao congelamento (VAAS; MARHEINE; SEUFERT, 2012).

A ausência de bandas exclusivas nas células não submetidas aos crioprotetores, e a presença naquelas tratadas, pode sugerir uma relação destas proteínas ao estresse provocado pela desidratação e/ou estímulo pelos crioprotetores. A redução do conteúdo de água, importante para a criopreservação (FULLER, 2004; WALTERS et al., 2008), pode representar um período de estresse intenso para as células (CHETVERIKOVA, 2009). Dessa forma, mecanismos que aumentem a tolerância osmótica, como o uso de crioprotetores, permitem uma desidratação mais intensa, resultando em maior sobrevida após o congelamento (VAAS; MARHEINE; SEUFERT, 2012).

Soluções crioprotetoras são usadas para reduzir a temperatura de nucleação do gelo, diminuir a taxa de crescimento de seus cristais e aumentar a temperatura de transformação vítrea (ANCHORDOGUY, 1991). Elas também são responsáveis por diminuir o tamanho das células e do citoplasma e/ou alterar as propriedades das paredes celulares e membranas, permitindo maior resistência às injúrias causadas pela desidratação como a deformação durante o resfriamento (OKTAY et al., 1998). Além disso, os acúcares presentes nestas soluções intereagem com membranas e outras proteínas, aumentando sua estabilidade durante o congelamento (VOLK, 2010). O tratamento com crioprotetores em embriões zigóticos de *Amaryllis beladonna* e *Haemanthus montanus*, ambos recalcitrantes, protege as enzimas com propriedades antioxidantes, permitindo o controle do sequestro de ROS e o controle da peroxidação de lipídeos (SERSHEN et al., 2012). O tipo preferencial de

crioprotetor, entretanto, pode variar de acordo com a espécie estudada. O efeito de diferentes açúcares, associados ao DMSO, foram testados em células embriogênicas de *P. nigra*, sendo a maltose e sacarose, os aúcares que permitiram uma maior sobrevivência das células criopreservadas (SALAJ et al., 2011).

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que que o sorbitol e DMSO permitiram com que as células de *A. angustifolia* pudessem ser criopreservadas e evidencia a importância das PAs, ABA e ROS como sinalizadores e moduladores do resfriamento. Assim, diferentes padrões de variação de tais compostos puderam ser elaborados, de acordo com o uso de crioproteores e sobrevivência à criopreservação. De acordo com a Fig. 2.7., para as células que resistem à criopreservação, um aumento gradual de PAs e ABA ao longo das etapas de criopreservação de ROS, logo após o tratamento com os crioprotetores e contato com gelo (B') pode ser observado enquanto que, para as células que não puderam ser recuperadas, PAs e ABA apresentam um pico o ABA logo após contato com gelo (B), seguido de decréscimo, e um aumento constante de ROS ao longo das etapas de criopreservação.

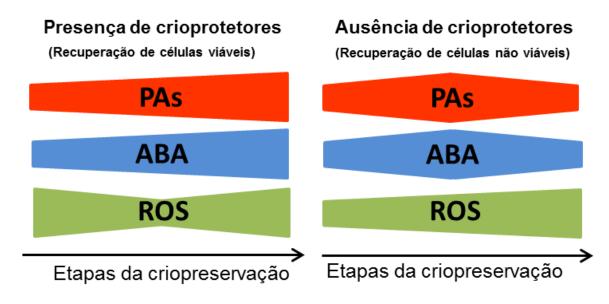


Figura 2.7. Variação do conteúdo de PAS, ABA e ROS durante a de *A angustifolia* ao longo do protocolo de criopreservação na ausência e presença de crioprotetores. As células viáveis correspondem àquelas que foram capazes de crescer após a recuperação.



Resumo: Técnicas de cultivo in vitro, associadas à criopreservação, são ferramentas importantes para conservação ex situ de espécies recalcitrantes. O sucesso da criopreservação depende de um equilíbrio entre a redução da umidade de um sistema para evitar a formação de cristais de gelo e sua resistência à desidratação e ao abaixamento de temperatura. Um método de criopreservação adequado reduz os riscos da formação de cristais de gelo, ao mesmo tempo em que evita danos biquímicos e mecânicos às células. O objetivo deste trabalho foi avaliar a taxa de desidratação e de tolerância à dessecação e ao resfriamento de embriões zigóticos de A. angustifolia, utilizando-se diferentes estratégias. Embriões foram desidratados utilizando-se jatos de ar comprimido (secagem ultrarrápida), meio WPM contendo 2M de sacarose, ou solução crioprotetora PVS2. As taxas de desidratação foram avaliadas em cinco segmentos do embrião, sendo observada maior resistência nas partes intermediárias, 2 e 3. Os embriões foram reidratados em meio WPM contendo 1,2 M de sacarose. Embriões dessecados abaixo de 0,5 g H₂0.g MS⁻ 1 (12 horas), pelo método de secagem ultrarrápida, apresentaram sinais visíveis de danos (escurecimento e impossibilidade de reidratação). Os embriões dessecados a cerca de 0,45 g H₂0.g MS⁻¹, usando 2 M de sacarose (8 horas), foram recuperados por reidratação. O conteúdo de água de embriões embebidos em PVS2 (2 horas), após pré-tratamento com sacarose 2M, apresentaram conteúdo de água reduzido para 0,35 g H₂0.g MS⁻¹. Neste tratamento, variações de conteúdo de água entre as diferentes partes não foram observadas. Entretanto, uma maior penetração de PVS2 na região da extremidade da radícula (parte 1) pode ser identificada. O conteúdo de água remanescente, necessário para preservar a viabilidade do embrião após a desidratação, impediu a criopreservação do mesmo. O grande tamanho do embrião, nesta espécie permitiu a sua utilização como um modelo para estudos da atuação dos crioprotetores.

3.1 Introdução

A maioria das sementes armazenadas em bancos de germoplasma são mantidas na forma desidratada, fundamental para a sua sobrevivência em temperaturas criogênicas evitando a cristalização do gelo, durante o congelamento (BERJAK; PAMMENTER, 2008). A tolerância à dessecação dos organismos está relacionada à habilidade de suportar a perda da água adsorvida às estruturas macromoleculares, particularmente nas superfícies de membranas, sem que ocorra desnaturação irreversível da última. Dessa forma, sugere-se que os tecidos tolerantes à dessecação sejam capazes substituir as moléculas de água, associada às superfícies de macromoléculas, por compostos poliidróxi (CLEGG, 1986; CROWE; CROWE, 1986).

A tolerância à dessecação é definida como a quantidade que um organismo pode resistir à perda de água, ou seja, o potencial osmótico mínimo suportado, a duração do tempo em que o organismo sustenta este baixo potencial osmótico, ou o crescimento do organismo durante este tipo de estresse. Na ausência dos mecanismos de tolerância à dessecação, o organismo perde a sua viabilidade em decorrência de alterações estruturais ou metabólicas (WALTERS et al., 2008).

O aumento da desidratação resulta em severos danos químicos e mecânicos às células (KAVIANI, 2011). Dessa forma, células com menor potencial osmótico e tolerância à salinidade possuem maiores chances de sobrevivência durante os tratamentos de criopreservação (VOLK, 2010). Em tecidos intolerantes à desidratação, a produção de radicais livres é uma das maiores causas de morte dos tecidos, prejudicando seu metabolismo, que requer. Consequentemente, a tolerância à dessecação e longevidade, depende da habilidade em sequestrar de radicais livres, que pode ser feito utilizando-se antioxidantes como glutationa, ascorbato, tocoferóis, além da capacidade de proteção contra os danos durante a dessecação e reparo aos danos causados durante a reidratação (KRANNER; BIRTIC, 2005).

As sementes recalcitrantes, como é o caso de *A. angustifolia*, apresentam elevado conteúdos de água e intolerância à dessecação. Nestes materiais, o modelo que descreve o comportamento homeohídrico sugere que, quanto maior for a

velocidade de desidratação, maior é a perda de água que as mesmas podem tolerar (FARRANT; PAMMENTER; BERJAK, 1986). Adicionalmente, no presente sistema vegetal, assim como a para a maioria das recalcitrantes, o grande tamanho da semente é um fator restritivo à rápida dessecação. Para contornar esta dificuldade, frequentemente são utilizados embriões excisados, os quais podem ser desidratados mais rapidamente (desidratação ultra-rápida ou *flash drying*). Esta metodologia tem sido considerada eficiente, especialmente quando relacionadas com certas técnicas, como por exemplo, dessecação a partir de sílica gel ativada (BERJAK et al., 1990).

Além da quantidade de água nessas sementes, a resistência à sua perda pode estar relacionado às propriedades da mesma no interior dos tecidos (BERJAK; PAMMENTER; VERTUCCI, 1992; VERTUCCI; FARRANT, 1995; VERTUCCI, 1990). Quando presente nos tecidos, a água apresenta diferentes propriedades físicas. Conforme é reduzida, as interações entre suas moléculas e as moléculas dos solutos tornam-se mais fortes. Dependendo da redução, a solução pode ficar tão concentrada que torna-se viscosa e com propriedades semelhantes àquelas observadas em vidros. Finalmente, em conteúdos de água muito baixos, característicos das sementes ortodoxas, toda a água remanescente está intimamente associada às superfícies das macromoléculas, e a sua mobilidade é reduzida, constituindo a chamada água ligada (PAMMENTER; BERJAK, 2000).

A calorimetria diferencial de varredura em DSC (*Differential scanning calorimetry*) é um tipo de análise térmica que permite mensurar e determinar a transição para o estado vítreo e a formação de cristais de gelo durante a criopreservação de diferentes sistemas (BILAVCÍK; ZÁMECNÍK; FALTUS, 2007). O equipamento mensura o fluxo de calor e as transições de estado da água em amostras em função da temperatura e/ou do tempo (HÖHNE; HEMMINGER, 2003). Os eventos são estimados a partir da diferença de temperatura entre uma cápsula de referência vazia e outra cápsula, contendo a amostra, sendo ambas resfriadas e aquecidas em uma mesma taxa (REVILLA; MARTÍNEZ, 2002). O equipamento recalcula o fluxo de calor diferencial e produz um gráfico, analisando o estado físico da água durante o resfriamento e aquecimento. As transições entre os estados líquido, vítreo amorfo e gelo podem ser

detectadas pelos picos de energia exotérmicos ou endotérmicos, sendo o ponto de transição do estado líquido conhecido como temperatura de transção vítrea (Tg) como transição para o estado vítreo. Os perfis térmicos proporcionam importantes informações sobre os tratamentos de crioproteção necessários para evitar a formação letal de gelo, e estabilização do estado vítreo (BENSON et al., 2006).

A conservação de sementes recalcitrantes em baixas temperaturas deve atender a uma condição onde o conteúdo de água ideal, nos tecidos das sementes. Assim, o conteúdo deve ser baixo o suficiente para que não ocorra a formação de cristais de gelo, e alto, o suficiente, para manter a sobrevivência e o desenvolvimento normal do embrião, após a recuperação da criogenia (REED et al., 2011).

No presente trabalho, com o objetivo de avaliar a sensitividade à dessecação dos embriões de *A. angustifolia*, foram utilizadas diferentes técnicas de desidratação, e os seguintes aspectos foram avaliados:

- a) obtenção de um conteúdo mínimo de água tolerado para a sobrevivência dos tecidos do eixo embrionário através de diferentes formas de desidratação, como a desidratação *flash drying* (ultrarrápida) e o uso de diferentes concentrações de sacarose combinados à solução de PVS2;
- b) propriedades térmicas da água remanescente nos tecidos;
- c) danos mecânicos e metabólicos após desidratação;
- d) correlação entre as estratégias de desidratação dos tecidos e a sensitividade para a dessecação.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Material vegetal

Sementes maduras de *A. angustifolia*, provenientes de populações naturais foram adquiridas em abril, maio e junho de 2011. As sementes foram mantidas sob refrigeração à temperatura de 5 °C.

Em decorrência do grande tamanho do embrião, e objetivando investigar o comportamento de suas diferentes regiões, após os tratamentos de desidratação, o embrião foi dividido em cinco partes (Fig. 3.1.). As quatro primeiras partes foram compostas pelo eixo hipocótilo-radicular, e a quinta parte contendo a porção do cotilédone, mais próxima do eixo embrionário.

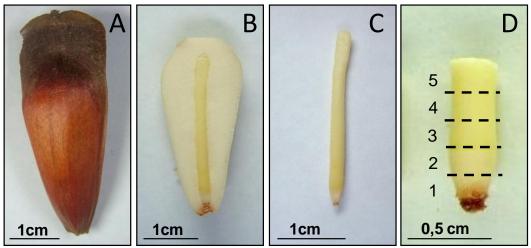


Figura 3.1. Semente e embriões de *A. angustifolia*: (A): sementes maduras com testa; (B): semente sem testa e cortada longitudinalmente expondo o embrião; (C): embrião inteiro isolado; (D): partes obtidas a partir de corte transversal do embrião. As partes 1 a 4 pertencem ao eixo hipocótilo-radicular, e a parte 5 pertencem ao cotilédone.

A sequência de metodologias utilizadas para a avaliação da tolerância à dessecação dos embriões foi resumida no organograma abaixo (Fig. 3.2.) e descritas em detalhes a seguir:

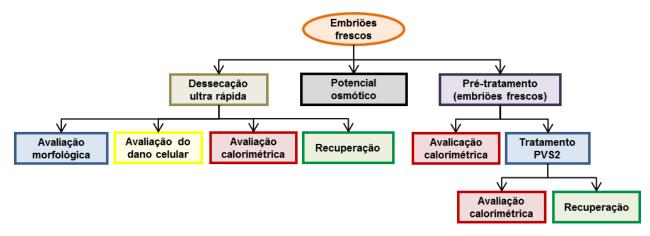


Figura 3.2. Metodologias utilizadas para o estudo da tolerância à dessecação em embriões de *A. angustifolia*. M: molar; PVS 2: solução de vitrificação de plantas (Sakai, 1990).

3.2.2 Metodologias

3.2.2.1 Métodos de desidratação

3.2.2.1.1 Desidratação ultra-rápida (flash-drying)

A desidratação ultra-rápida (*flash-drying*) dos embriões foi realizada pela passagem de nitrogênio à temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C) em fluxo de 9 L/min. Este procedimento foi realizado utilizando-se arejadores colocados de forma paralela no fundo de um caixa recipiente plástico (10 x 10 x 4 cm), abaixo de uma fina malha de nylon, de forma a difundir o nitrogênio liberado dentro da mesmo (Fig. 3.3).

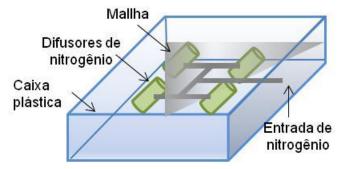


Figura 3.3. Equipamento de dessecação ultra-rápida (*flash-drying*) contendo caixa plástica, malha de tecido, na qual as sementes são acomodadas, e entradados difusores de nitrogênio.

Testes dos diferentes tempos de desidratação foram realizados utilizando os embriões inteiros isolados dos megagametófitos, os quais foram colocados sobre a malha de nylon, recebendo jato indireto de nitrogênio durante 0, 20, 40, 60, 100 e 180 minutos. Após 180 minutos de desidratação, os embriões continuaram a apresentar alto teor de umidade assim, um lote destes embriões foi colocada sobre sílica gel ativada. O sistema formado pelos embriões e a sílica foram então submetidos à vácuo por um período de 12 horas.

3.2.2.1.2 Desidratação a partir de substâncias crioprotetoras

Os embriões inteiros, isolados dos megagametófitos, foram colocados em frascos de Erlenmeyer com solução de pré-tratamento (2 M de sacarose em meio líquido WPM (LLOYD; B, 1981) e mantidos por agitação por períodos de 4, 8, 16 e 24 horas. Após cada período de tempo, um lote de embriões foi separado para análise DSC (*Differential Scanning Calorimetry*), detalhado abaixo (ítem 3.2.2.2.3), e outro lote foi submetido ao tratamento com PVS2 (30% glicerol, 15% etilenoglicol, 15% DMSO em meio líquido WPM com 0,8 M sacarose (v/v)] (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990).

Os embriões pré-tratados por 24 horas foram colocados em frascos de Erlenmeyer com solução crioprotetora de PVS2 e mantidos por agitação por 5, 15, 30, 60 minutos. Objetivando avaliar a toxicidade do PVS2, embriões tratados com a solução crioprotetora por 60 minutos, foram mantidos em meio líquido WPM contendo 1,2 M de sacarose por 120 minutos, a fim de se retirar a solução de PVS2 e a seguir, colocados em placas de Petri com papel de filtro embebido em água destilada e mantidos à 25 °C, com 16 horas de fotoperíodo. Este material foi avaliado, durante sete dias, considerando os seguintes parâmetros: coloração, e desenvolvimento da gema apical.

3.2.2.2 Avaliação dos tecidos

3.2.2.2.1 Derrame de eletrólitos

Para a avaliação dos tecidos, como danos celulares decorrentes da dessecação os eixos embrionários, embriões inteiros, representativos de cada período de desidratação foram inicialmente umidificados em atmosfera de 100% de umidade relativa, e a seguir, colocados em 2 ml de água destilada. A taxa de vazamento de eletrólitos foi medida individualmente, a partir de três replicatas. O vazamento foi monitorado a cada 5 minutos, durante um período de 1 hora, utilizando-se um medidor de condutividade modelo ASAC-1000 (Applied Intelligence System Inc.; Neogen, Lansing, Mich., USA). As médias das taxas de vazamento foram correlacionadas com as médias dos pesos secos das respectivas replicatas (BERJAK; PAMMENTER; VERTUCCI, 1992).

3.2.2.2.2 Ensaio de viabilidade com glutationa

Embriões inteiros, isolados dos megagametófitos, foram embebidos em solução de glutationa em diferentes concentrações (0; 0,1; 0,5 e 1 mM) durante 4 horas. Em seguida, foram desidratados de forma ultrarrápida por 100 minutos, colocados em placas de Petri com papel de filtro embebido em água destilada e avaliado após sete dias de recuperação, à temperatura de 25 °C com 16 horas de luz e 8 de escuro.

3.2.2.2.3 Determinação do conteúdo de água

Após os tratamentos de desidratação, as diferentes partes isoladas dos embriões (ítem 3.2.2.1.) foram seladas em cápsulas de alumínio, evitando-se a troca de água do material com o meio externo. A seguir, as amostras tiveram as cápsulas perfuradas e colocadas à temperatura de 95 °C, por 36 horas, tempo suficiente para a estabilização da massa seca (MS). O conteúdo de água foi calculado a partir da diferença entre a

massa fresca (MF) e a massa seca, de cada amostra, e expresso com base de g H₂O g⁻¹ de massa seca.

3.2.2.2.4 Determinação do potencial osmótico

Foram realizados dois diferentes procedimentos para a determinação do potencial osmótico dos embriões. O primeiro foi realizado utilizando-se concentrações variáveis de polietilenoglicol (PEG) (MM: 8.000): 0,1; 0,25; 0,35; 0,45; 0,55; 0,65; 0,75; 0,85 e 1,15 mg/mg de H₂O. O segundo foi realizado a partir da utilização de soluções salinas saturadas de K₂NO₄, KNO₃ e KCI.

Para tanto, as diferentes partes do embrião foram mergulhados em:

- a) soluções de PEG (concentrações acima descritas), por 48 horas, sob agitação e mantidos à 25 ± 2 °C.
- soluções salinas (acima citadas) acondicionadas em câmaras fechadas. Os embriões foram acomodados dentro das câmaras, sem contato direto com as soluções, e mantidos por 72 horas.

Após os diferentes tempos de desidratação ultrarrápida, os segmentos tiveram seu conteúdo de umidade avaliados, como descrito no item 3.2.2.2.3. Cada valor de umidade determinado foi relacionado com os potencias osmóticos de cada um dos tratamentos, previamente conhecidos.

3.2.2.2.5 Análise das propriedades térmicas da água em DSC (*Differential Scanning Calorimetry*)

As propriedades térmicas da água foram analisadas utilizando-se um DSC-7 Perkin-Elmer (Norwalk, CT), utilizando-se como padrões de calibração, para temperatura o diclorometano (-95 °C) e o indium (156,6 °C), e para energia, o indium (28,54 J g⁻¹) (BALLESTEROS; WALTERS, 2007).

A presença de transições de fase da água foram determinadas a partir dos termogramas de descongelamento registrados entre -120 e 30 °C, utilizando-se uma variação de temperatura de 10 °C.min⁻¹. A temperatura de transição para a fusão foi

determinada pela intersecção entre a linha de base e a linha formada pelo segmento mais íngreme do pico. A variação de entalpia (ΔH) foi determinada a partir da área inserida do pico com a linha de base e expressa na base de grama de massa seca. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software Pyris 7 Perkin-Elmer.

3.2.2.3 <u>Análise de dados</u>

As avaliações foram realizadas em triplicatas. Como controle, foram utilizados eixos embrionários frescos não desidratados. A média e o desvio padrão para cada tratamento foram determinados utilizando-se o programa Excel 2010.

A recuperação dos eixos embrionários nos diferentes tratamentos foi avaliada morfologicamente considerando-se: presença de coloração verde e o desenvolvimento do meristema apical.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Efeitos da dessecação ultrarrápida ou com crioprotetores

A redução do conteúdo de água e não resfriamento propriamente dito é considerado o ponto crítico para a sobrevivência de um material biológico durante a criopreservação (RAMON et al., 2002). No presente trabalho, o conteúdo de água que permanece no embrião durante a dessecação ultra-rápida pode ser acompanhada na Fig. 3.3. De acordo com os resultados, o embrião fresco não desidratado de *A. angustifolia*, concentrou maior quantidade de água nas partes 1 e 2, justamente aquelas mais próximas ao ápice radicular. A porção que concentra o menor conteúdo de água foi aquela que contém o cotilédone, ou seja, a parte 5. Ao longo do processo de desidratação ultra-rápida, a parte 2 tende a manter níveis mais altos de água, em relação às demais partes avaliadas. A parte 1, em contrapartida, desidratou-se mais rapidamente, apresentando o mais baixo nível de hidratação ao final do tratamento.

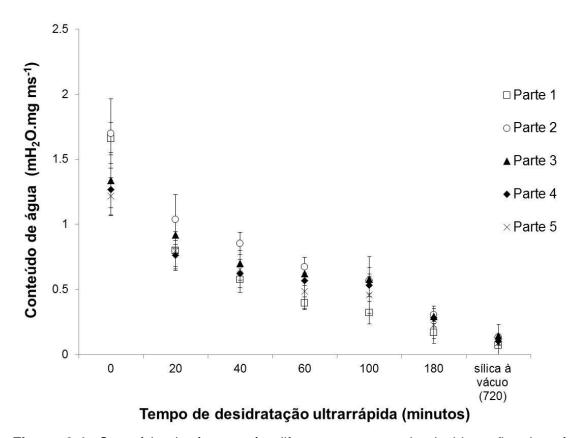


Figura 3.4. Conteúdo de água após diferentes tempos de desidratação ultrarrápida (*flash drying*) e em sílica, a vácuo, em diferentes partes do embrião zigótico de *A. angustifolia*.

Após sessenta minutos de desidratação, os embriões apresentam umidade com cerca de 0,67 mg H₂0. mg⁻¹ MS (Fig. 3.4.), potencial osmótico de -8,125 MPa (Fig. 3.5.). Estudos revelam que para sementes recalcitrantes, a dessecação dos eixos embrionários, sob condições de desidratação ultra-rápida, permite com que os mesmos sobrevivam a baixos conteúdos de água (0,28-0,44 mg H₂0. mg⁻¹ MS), condição equivalente a um potencial osmótico de -11,3 MPa. Esse nível de umidade é próximo ao ponto,em que apenas água não congelável, está presente nos tecidos (BERJAK; VERTUCCI; PAMMENTER, 1993; PAMMENTER; VERTUCCI; BERJAK, 1993; VERTUCCI, 1990). Os resultados obtidos em nosso sistema de estudo demonstram que, através da desidratação ultra-rápida não foi possível atingir os níveis de umidade e potencial osmóticos suficientes para a manutenção de sua viabilidade, após resfriamento em temperaturas criogênicas.

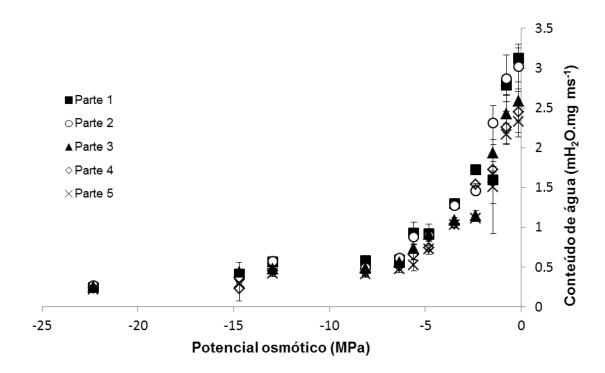


Figura 3.5. Conteúdo de água das diferentes partes do embrião zigótico maturo de *A. angustifolia* em diferentes potenciais osmóticos.

Em relação ao aspecto morfológico, avaliados após de sete dias da recuperação, pode-se observar que apenas os embriões desidratados por até 60 minutos, permaneceram vivos, ou seja, tornaram-se verdes. Em períodos superiores de desidratação, os embriões apresentaram coloração marrom, provavelmente refletindo uma condição de oxidação e perda de viabilidade do material, não sobrevivendo após a reidratação (Fig. 6).

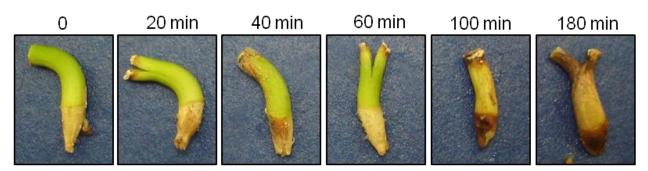


Figura 3.6. Aspecto morfológico dos embriões zigóticos de *A. angustifolia* sete dias após tratamento de desidração ultra-rápida (*flash drying*) no controle (0) e por diferentes períodos de tempo (20, 40, 60, 100 e 180 minutos).

Durante a dessecação, os danos celulares estão associados ao tipo de tecido, tempo de dessecação, e consequentemente, liberação de radicais livres e oxidação de lipídios (WALTERS et al., 2002). A avaliação de tais danos pode ser realizada pela quantificação da eletrocondutividade decorrente pelo derrame de eletrólitos de um tecido após danos ocorridos na membrana celular. Esta metodologia foi introduzida por Matthews e Bradnock (1967) que verificaram que tecidos não viáveis de P. sativum liberavam grandes quantidades de eletrólitos, e portanto, altos valores eletrocondutividade. Desde então, este tipo de avaliação vem sendo utilizado para as sementes recalcitrantes, na identificação dos danos em seus tecidos, após as diferentes metodologias de dessecação (BERJAK; VERTUCCI; PAMMENTER, 1993; PAMMENTER; VERTUCCI; BERJAK, 1991; VERTUCCI, 1989). Além dos sinais morfológicos de necrose do embrião, após um longo período de desidratação ultrarápida, as medidas do derrame de eletrólitos sugerem sinais de danos celular. Os resultados apresentados na Fig. 3.7. demonstraram que a taxa de vazamento de eletrólitos apresentou tendência de aumento, com a redução na umidade dos embriões, sugerindo danos às membranas do material, durante esta técnica de redução de umidade.

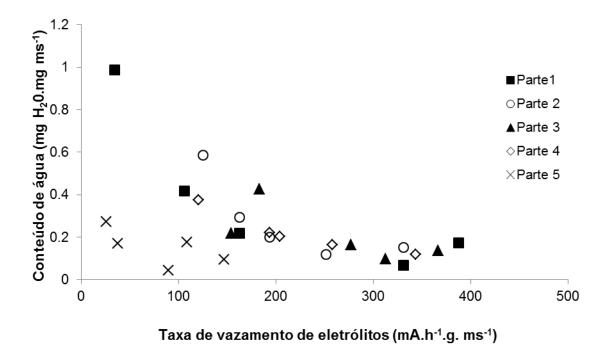


Figura 3.7. Taxa de vazamento de eletrólitos monitorado por eletrocondutividade nas diferentes partes do embrião de *A. angustifolia* em diferentes conteúdos de água após desidratação ultrarrápida (*flash drying*).

Avaliando-se o conteúdo de água nas diferentes partes do embrião durante a desidratação com crioprotetores (Fig. 3.8 e 3.9) foi verificado um comportamento diferencial da água, no embrião de *A. angustifolia*, quando comparado com a desidratação ultra-rápida.

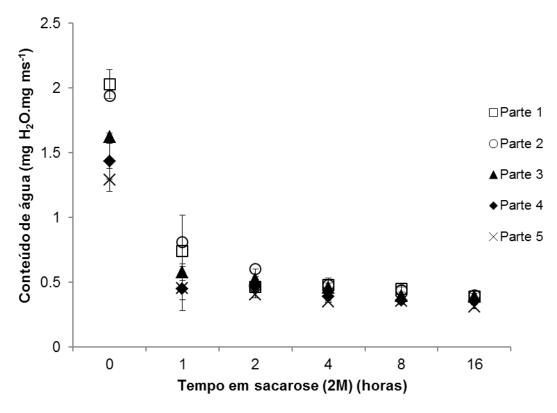


Figura 3.8. Conteúdo de água após diferentes tempos de desidratação em meio de cultura WPM contendo 2 M de sacarose, em diferentes partes do embrião zigótico maturo de *A. angustifolia*.

De acordo com a Fig. 3.8, observa-se que a parte 2, durante a desidratação em meio de cultura WPM contendo 2 M de sacarose, apresentou uma maior tendência à manutenção do conteúdo de água, em relação às demais partes. Uma estabilização no nível de hidratação, em cerca de 0,45 mg H2O.mg ms⁻¹, em todos os segmentos, pode ser observada após 4 horas de tratamento. Considerando-se que, durante a desidratação ultra-rápida o conteúdo de água mínimo para manter o embrião viável foi de cerca de 0,39 mg H₂0. mg ms⁻¹, obtido aos 60 minutos de tratamento, o uso da solução de meio com sacarose 2 M permitiu maior redução de umidade para os embriões, em relação ao método anterior.

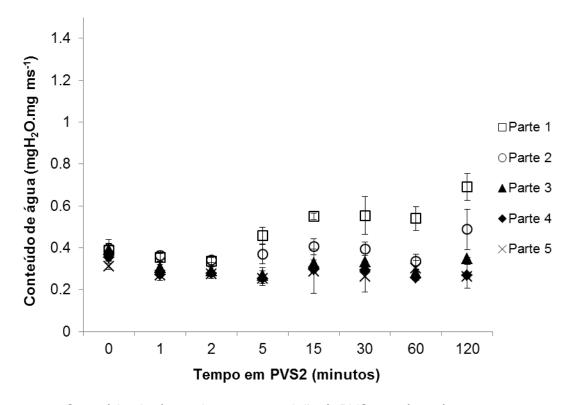


Figura 3.9. Conteúdo de água durante exposição à PVS2, após pré-tratamento em meio de cultura WPM contendo sacarose 2 M por 16 horas, em diferentes partes do embrião zigótico de *A. angustifolia*.

Os embriões pré-tratados com sacarose e em seguida, tratados com PVS2, rapidamente decresceram seu conteúdo de água, com valores próximos a 0,3 mg H₂0.mg ms⁻¹ (Fig. 3.9), sem que os embriões perdessem a viabilidade. Da mesma forma como observado durante as desidratações anteriores (ultra-rápida e em meio com 2M de sacarose), houve uma tendência de manutenção da umidade nas partes 1 e 2 do embrião. Entretanto, tal tendência foi observada apenas nos primeiros dois minutos de imersão na solução. De forma não esperada, o conteúdo de água calculado a partir dos primeiros 5 minutos de tratamento em PVS2, aumentou nas diferentes partes do embrião, sobretudo em 1 e 2. Essa observação não corresponde ao esperado, pois a função básica dos componentes das soluções de vitrificação é a retirada de água das células (VOLK; WALTERS, 2006). O DMSO, um dos componentes da solução de vitrificação, trata-se de solvente polar com propriedades de dissolver tanto componentes apolares quanto polares. Devido sua alta capacidade de atravessar as

membranas biológicas, é provável que um aumento de massa, conforme observado durante o tratamento com PVS2 (Fig. 3.9), represente não um aumento no conteúdo de água da célula, mas sim, a substituição desta pela solução de vitrificação.

O método de dessecação escolhido é essencial para a determinação da integridade dos componentes celulares e dos processos metabólicos, definindo a umidade mínima que um tecido pode suportar (WALTERS et al., 2001). A substituição dos líquidos celulares pelo DMSO, proposta acima, preservaria a forma das estruturas celulares, evitando a sua deformação e auxiliando na conservação de suas estruturas durante a recuperação do material criopreservado (VOLK; WALTERS, 2006).

A hipótese de que a desidratação continue ocorrendo durante o tratamento com PVS2 é corroborada pelos resultados dos valores de entalpia apresentados pelas diferentes partes do embrião (Fig. 3.10). A variação de entalpia (ΔH) é a quantidade de energia demandada pela água para derreter, no caso da água livre, ou passar de um estado vítreo para o líquido, no caso da água não congelável. Seus valores podem ser obtidos a partir da análise de termogramas dos embriões de *A. agustifolia.* Dessa forma, como os valores de ΔH decrescem ao longo do tratamento com a solução de vitrificação, obrigatoriamente, o conteúdo de água também deve ter decrescido ao logo deste tratamento.

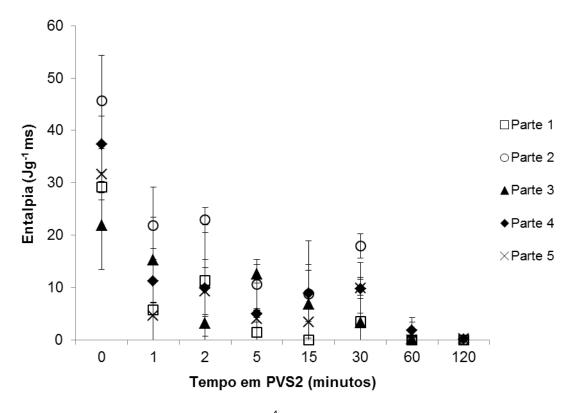


Figura 3.10. Variação de entalpia (Δ H) (Jg⁻¹.ms) para as diferentes partes do embrião de *A. angustifolia*, durante exposição à PVS2, após pré-tratamento de desidratação em meio de cultura WPM contendo 2 M de sacarose por 16 horas.

Após o pré-tratamento em meio contendo 2M sacarose e tratamento com PVS2, o conteúdo de água dos embriões de *A. angustifolia* alcançou, após 150 minutos em meio de recuperação, níveis próximos daqueles observados para os embriões frescos, ou seja, não submetidos a qualquer tipo de tratamento (Fig. 3.11). Após esse período, os embriões sobreviveram e desenvolveram a coloração verde, após sete dias em recuperação (Fig. 3.12), demonstrando que o tratamento não foi tóxico para o material.

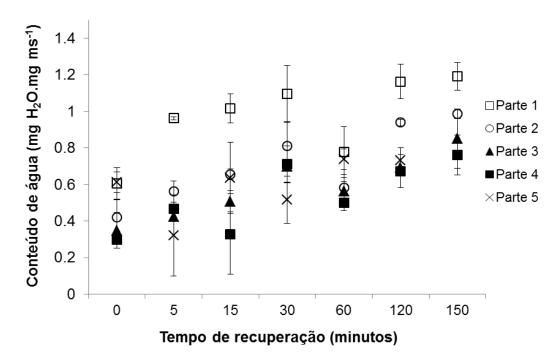


Figura 3.11. Conteúdo de água durante a recuperação em meio WPM contendo 1,2 M de sacarose após pré-tratamento em meio de cultura WPM contendo sacarose 2 M por 16 horas, seguido de tratamento e exposição à PVS2 por 2 horas, em diferentes partes do embrião zigótico maturo de *A. angustifolia*.



Figura 3.12. Embrião zigótico de *A. angustifolia* sete dias após tratamento de desidratação pré-tratado em meio líquido com 2 M de sacarose, seguido de PVS2 e recuperação em meio liquido com 1,2 M de sacarose

3.3.2 Análise das propriedades térmicas da água em DSC

Além da análise do conteúdo total de água nos tecidos, uma avaliação do estado de água presente nos tecidos foi realizada, nos diferentes tratamentos em que os

embriões de *A. angustifolia* foram submetidos. A análise térmica de material vegetal usando DSC demonstra uma forte relação entre a presença de água congelável ou a temperatura de fusão do material com os danos em temperaturas abaixo de zero. Conteúdo de água abaixo de 0,25 g/g massa seca geralmente se refere à água não congelável, indicando que a restrição de motilidade das suas moléculas é suficiente para que a reorganização e recristalização da mesma ao longo do tempo (revisado por VOLK; WALTERS, 2006).A água livre ou pura corresponde aos picos agudos que podem ser observados em torno de 0 °C, que são atribuídos ao descongelamento de gelo, e a água ligada, corresponde aos picos largos presentes abaixo dessa temperatura (BALLESTEROS; WALTERS, 2007). Atribuídos à formação de gelo, picos agudos, devem, portanto, estar ausentes nos termogramas do material que se deseja criopreservar, visto que a formação de cristais de gelo pode provocar rompimento de membranas e morte dos tecidos da semente (BERJAK; PAMMENTER; VERTUCCI, 1992).

O gráfico de termograma de aquecimento, dos embriões recém coletados das sementes, não submetidos a nenhum tratamento de desidratação, permite a observação de altas variações de energia interna (ΔH) nas temperaturas em torno de zero grau, representada por picos largos e agudos em todas as partes do embrião de *A. angustifolia* observados (Fig. 3.13.), representando o descongelamento de água livre e em solução dentro dos tecidos.

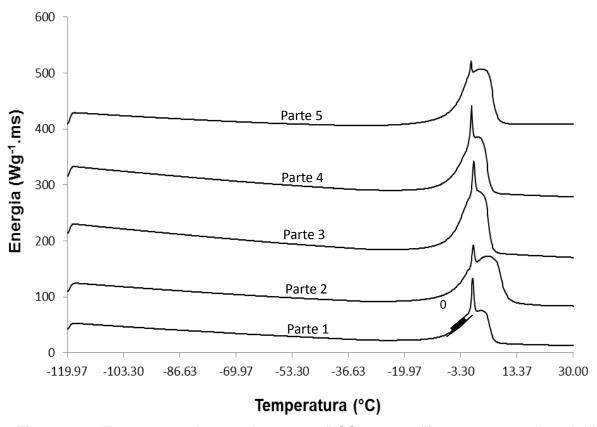


Figura 3.13. Termograma do aquecimento em DSC para as diferentes partes do embrião de *A. angustifolia* recém retirado da semente, não submetido aos tratamentos de desidratação, evidenciando as mudanças de estado da água.

A desidratação ultra-rápida do embrião, permitiu uma redução de ΔH. Entretanto, após 60 minutos de desidratação, período máximo suportado sem perda de viabilidade, o embrião ainda apresenta picos de água livre em seus termogramas nas partes 3, 4 e 5 (Fig. 3.14.). A desidratação, nesse caso, não foi homogênea e a presença de água congelável inviabilizaria as tentativas de criopreservação dos embriões, devido ao alto risco de formação de cristais de gelo.

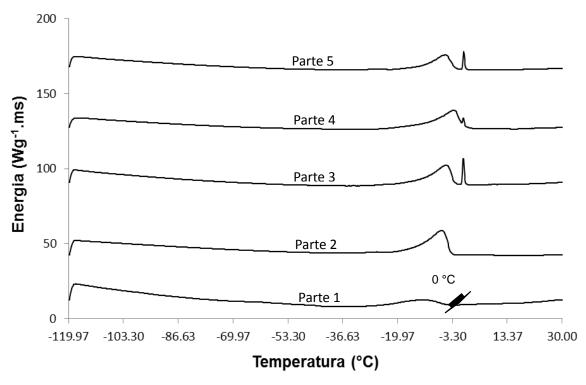


Figura 3.14. Termograma do aquecimento em DSC para as diferentes partes do embrião de *A. angustifolia*, após 60 minutos de desidratação ultra-rápida, evidenciando as mudanças de estado da água.

Por outro lado, os pré-tratamentos de desidratação em meio líquido com 2 M de sacarose, seguido de tratamento com PVS2 permitiram resultados mais homogêneos entre as diferentes partes do embrião, além de baixo ΔH e nenhum pico de água livre (Fig. 3.15.).

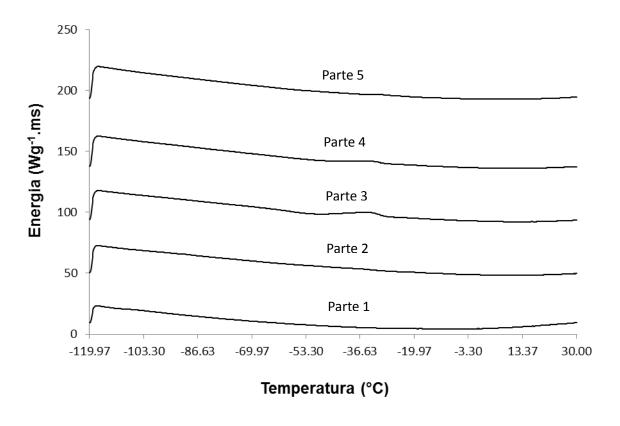


Figura 3.15 Termograma do aquecimento em DSC para as diferentes porções do embrião zigótico maturo de *A. angustifolia* submetido à pré-tratamento de 2 M de sacarose por 16 horas, seguido do PVS2 por 1 hora, evidenciando mudanças no estado da água.

Resultados semelhantes em relação ao ΔH, evidenciado graficamente nos termogramas de DSC, foram observados para ápices caulinares de alho e menta (*Allium sativum* e *Mentha* sp., respectivamente) (VOLK; WALTERS, 2006). Nestes sistemas, foi observada uma redução progressiva de ΔH, conforme o tempo de exposição crescente ao PVS2. Adicionalmente, ocorreram eventos de recristalização, em ápices expostos por 5 ou 15 minutos em PVS2, que não puderam ser mais observados a partir de 30 minutos de exposição na solução crioprotetora, para ambos os ápices estudados. Foi sugerido que, os crioprotetores teriam o efeito de desidratar as células, diminuindo a probabilidade de permanecer água congelável nas mesmas. Análises térmicas em DSC revelaram que o tratamento com DMSO em ápices de batata (*Solanum tuberosum*), apesar de permitir que certa quantidade de água fosse

cristalizada durante o reaquecimento, a transição para o estado vítreo pode ser observada, e o material pode ser recuperados com viabilidade. Provavelmente, se cristais de gelo foram formados, estes ocorreram no espaço extracelular ou se dentro do citoplasma, devem ter sido formados em tamanhos bastante reduzidos, de forma a permitir a sobrevivência e recuperação dos tecidos, em caso de danos (KACZMARCZYK, 2008).

Diferentemente do observado para o tratamento de desidratação ultra-rápida, a exposição à PVS2 por até 2 horas não se mostrou letal para os embriões de *A. angustifolia*. Além disso, após recuperação em meio contendo 1,2 M de sacarose, puderam ser reidratados a ponto de já apresentam picos de água livre nos termogramas (Fig. 3.16.). A resistência dos embriões à elevado período de tempo nesta solução, comparado com outros sistemas vegetais, pode estar associado a uma velocidade mais lenta de penetração dos crioprotetores. Ápices caulinares de *P. kesiya* puderam ser criopreservados com sucesso pela técnica de vitrificação. Entretanto, exposição à solução de vitrificação por mais de 10 minutos se mostraram tóxicos para este sistema (KALITA et al., 2012).

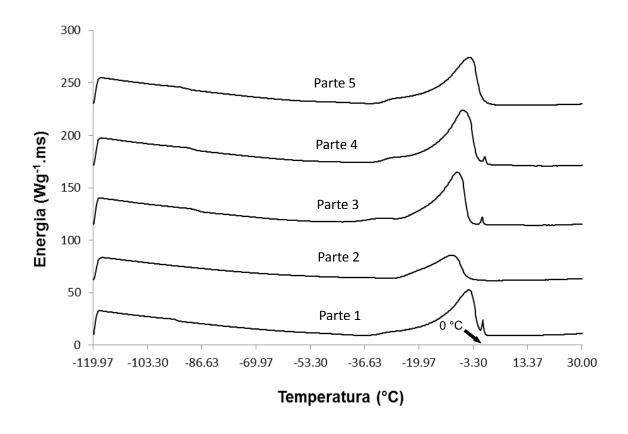


Figura 3.16. Termograma do aquecimento em DSC para as diferentes partes do embrião zigótico maturo de *A. angustifolia* zigótico maturo de *A. angustifolia* submetido à pré-tratamento de 2 M de sacarose por 24 h, seguido do PVS2 por 2 h e recuperação em meio liquido contendo 1,2 M de sacarose, evidenciando mudanças no estado da água.

3.3.3 Efeito da glutationa na desidratação ultrarrápida

A glutationa consiste em um dos principais antioxidantes intracelulares, com papel essencial para a resistência à dessecação e como sinalizador do início da morte celular programada. A falha do sistema antioxidante durante a dessecação por períodos prolongados parece atuar com gatilho para a morte celular programada, causando envelhecimento e eventual morte do organismo (KRANNER; BIRTIC, 2005). Frequentemente, a glutationa é utilizada nos pré-tratamentos e durante a criopreservação em sistemas vegetais e animais (ANSARI; RAKHA, 2010; WANG; DENG, 2004).

O aspecto morfológico dos embriões de *A. angustifolia*, embebidos em diferentes soluções de glutationa, seguido de desidratação ultrarrápida, está apresentado na Fig. 3.17.



Figura 3.17. Aspecto morfológico dos embriões de *A. angustifolia* embebidos em solução de glutationa (controle; 0,1; 0,5 e 1 mM) por 4 h, não desidratadas e desidratadas por 100 min em dessecação ultra-rápida.

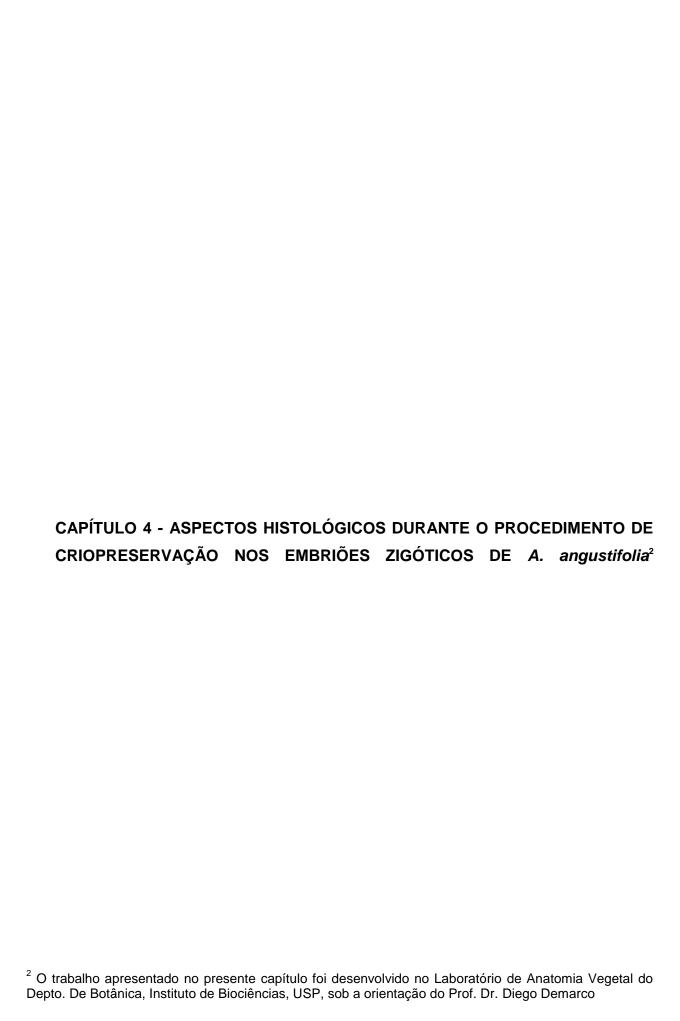
Como pode ser observado, a glutationa não foi tóxica, mesmo em altas concentrações (1 mM), pois os embriões embebidos na solução continuaram vivos e se desenvolveram, adquirindo a coloração verde, característica. Apesar disso, efeito protetor não pode ser reportado, já que os embriões previamente embebidos nas soluções e em seguida, dessecados por 100 minutos não apresentaram redução na mortalidade, em relação aos embriões dessecados pelo mesmo tempo não expostos ao antioxidante.

A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que a desidratação química com crioprotetores, em relação à desidratação ultra-rápida, permitiu uma redução no conteúdo de água mais intensa nos tecidos dos embriões de *A. angustifolia*. Além de permitir uma dessecação mais homogênea entre as diferentes partes estudadas do embrião, o uso de crioprotetores permitiu maior redução nos pico de energia que

representam a água congelável nos tecidos, sem, no entanto, afetar a viabilidade dos embriões.

O tratamento com os crioprotetores, seguido de exposição ao nitrogênio líquido, não foi capaz de impedir a morte dos embriões após o reaquecimento e a reidratação. Tal fato evidencia que a sensitividade à dessecação na espécie estudada não se restringe apenas à perda de água, mas também a fatores fisiológicos ainda não reduzir os danos fisiológicos a partir do efeito dos antioxidantes não revelou efeito protetor ao congelamento/descongelamento nos embriões para A. angustifolia. Estudos de calorimetra durante a criopreservação de embriões somáticos de P. sitchensis demonstraram que a dificuldade em manter a viabilidade do material, não poderia ser atribuída a fatores biofísicos (GALE; BENSON; HARDING, 2013), de forma semelhante ao que foi observado no presente trabalho para os embriões zigóticos de A. angustifolia. De acordo com os autores deste estudo, testes empíricos de protocolos e investigações básicas são as abordagens normalmente aplicadas para estudar recalcitrância durante o armazenamento de germoplasma vegetal. No entanto, eles podem ficar aquém das soluções possíveis, mesmo após a experimentação exaustiva, sendo a geração de dados negativos de sobrevivência uma dificuldade para se planejar futuras investigações.

Apesar da não obtenção de um método eficaz para a criopreservação dos embriões zigóticos para a espécie em questão, o grande tamanho do embrião permitiu observações inéditas de como os crioprotetores atuam nas diferentes partes do embrião. Dessa forma, a caracterização do comportamento da água e as ΔH durante diferentes tratamentos de desidratação dos embriões de *A. angustifolia*, permitiu a obtenção de informações relevantes, não apenas para estratégias de criopreservação do sistema, mas como fonte de subsídio para o estudo da criopreservação de sistemas sensíveis à dessecação.



Resumo: O sucesso da criopreservação depende da prevenção de uma série de danos estruturais/mecânicos e fisiológicos ocorridos durante os diferentes passos do processo. O objetivo deste trabalho foi observação das alterações cito-histológicas ocorridas durante o procedimento de vitrificação de embriões zigóticos de A. angustifolia. Embriões maturos foram resfriados em nitrogênio líquido com e sem prétratamento de 2 M de sacarose por 8 h, seguido ou não de tratamento de PVS2 por 2 h, e comparados a embriões não resfriados. Apenas os embriões que não entraram em contato com o nitrogênio líquido continuaram vivos. Para a análise do embrião inteiro, ao longo de cada etapa de criopreservação, os embriões foram fixados em FAA e FNT, desidratados em série etílica, incluídos em resina, seccionados e corados com azul de toluidina 0,05% ou reagente de Lugol. Para a análise da organização e aspecto das estruturas celulares, os embriões foram fixados em glutaraldeído, pós-fixados em tetróxido de ósmio, seccionados em cinco partes, desidratados em série cetônica e incluídos em resina Spurr. Secções semifinas foram coradas com azul de toluidina e as observações, registradas em microscópio de luz. A presença de grãos de amido é marcante em todos os tecidos do embrião, sobretudo no hipocótilo e cotilédones e, de forma inesperada, no meristema apical caulinar e na protoderme. Os embriões expostos às diferentes etapas do procedimento de criopreservação ou diretamente mergulhados em nitrogênio líquido, sem crioprotetores, apresentaram um maior número de células mortas, quando comparados ao controle, não resfriado. Além disso, os núcleos possuíam muitas regiões de heterocromatina. Espaçamento entre as células nos tecidos embrionários ocorreram nos diferentes tratamentos, sendo mais evidentes naqueles submetidos a todas as etapas de criopreservação. Variações nas respostas foram observadas ao longo dos segmentos estudados. Verificou-se a existência de gradiente morfológico e fisiológico ao longo do eixo embrionário e cotilédones de A. angustifolia, fato que dificulta a otimimização de um único protocolo de criopreservação.

80

4.1 Introdução

Sementes são a principal forma de propagação em plantas e, portanto, o método mais comum de conservação *ex situ* (SANTOS, 2001). O estoque de germoplasma vegetal *ex situ* é importante tanto para a manutenção da diversidade genética de espécies de uso humano quanto para a conservação de espécies ameaçadas na natureza. Para tanto, tais bancos se aproveitam do mecanismo de dessecação natural de tais propágulos (PENCE, 1995) que, se resistem a uma perda de umidade até cerca de 5% do teor de umidade inicial, podem ser armazenadas a aproximadamente -18 °C e ser conservadas por muitas décadas (ROBERTS, 1973).

Entretanto, esse tipo de conservação não se aplica às sementes recalcitrantes, que se mantêm metabolicamente ativas após a dispersão (FINCH-SAVAGE, 1996), sensíveis à desidratação, não apenas durante o desenvolvimento, mas também após a dispersão (BERJAK; PAMMENTER, 2008). Nesse sentido, a criopreservação oferece a única opção para a conservação em longo prazo das sementes intermediárias e recalcitrantes (BERJAK; PAMMENTER, 2008; HÄGGMAN; RUSANEN; JOKIPII, 2008; SANTOS, 2000).

Dentre as técnicas de criopreservação, destaca-se a vitrificação, procedimento baseado no uso de uma mistura contendo alta quantidade de crioprotetores, em proporções que permitem uma baixa toxicidade em plantas. Em contato com o material vegetal, permite ultrarresfriamento do sistema em temperatura abaixo de -100 °C, atingindo a vitrificação à -115 °C (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990; SAKAI, 2000). Apesar de seus primeiros registros remontarem o final da década de 80 do final, por URAGAMI et al. (1989) e LANGIS et al. (1989), ainda é necessário grande esforço de investigação da tecnologia da criopreservação para que esta possa oferecer soluções gerais para os problemas de conservação dos recursos genéticos de espécies que apresentam sementes recalcitrantes (BERJAK; PAMMENTER, 2000) em decorrência do seu limitado conhecimento (HELLIOT et al., 2003).

Dentre os problemas causados durante a criopreservação, destacam-se os danos estruturais/mecânicos, fisiológicos e bioquímicos ocorridos durante os diferentes passos do processo. As retrações das membranas e a alteração do potencial hídrico causados pela desidratação variam de acordo com a velocidade de congelamento, a

qual está diretamente relacionada à formação de cristais de gelo. Estes cristais são responsáveis pelo rompimento e perda da permeabilidade seletiva de membranas, além das alterações metabólicas, causadas pelo "efeito osmótico" (MAZUR, 1977). Dentre os danos celulares, destacam-se a degeneração vacuolar (KITO K, KAGAMI H, KOBAYASHI C, UEDA M, 2005), alteração da parede celular, redução do tamanho e número dos grãos de amido nos plastídeos, condensação da cromatina com nucléolo altamente compactado (ROWNTREE et al., 2007). Avaliações cito-histológicas são, portanto, interessantes para o estudo do comportamento recalcitrante das sementes, e de suas respostas, sob uma variedade de condições de criopresevação (PAMMENTER; BERJAK, 1999).

Como detalhado no **CAPÍTULO 3**, um tratamento com PVS2 (*Plant vitrification solution*) foi realizado em embriões zigóticos maturos de *A. angustifolia* como parte de um estudo de tolerância à dessecação dos mesmos. Dentre os procedimentos testados, a vitrificação foi o único método capaz de manter os embriões viáveis, ou seja, capazes de tornarem-se verdes e/ou desenvolver o meristema apical, após a desidratação. Entretanto, os materiais não foram capazes de resistir ao abaixamento de temperatura, perdendo a viabilidade após a exposição ao nitrogênio líquido. Resumidamente, de acordo com os resultados do capítulo citado, verificou-se que:

- a) somente o protocolo que utiliza crioprotetores nas etapas anteriores ao congelamento permite uma desidratação tolerável para os embriões, apesar dos mesmos perderem a viabilidade quando expostos ao nitrogênio líquido (NL);
- b) os embriões recém retirados das sementes apresentam níveis de umidade iniciais mais altos nas partes 1 e 2. Tais segmentos apresentam uma desidratação mais rápida do que as demais partes do embrião, quando em contato com meio de cultura WPM contendo 2M de sacarose. A partir de 16 horas de exposição, um nível de umidade homogêneo entre as diferentes partes estudadas é atingido. Após exposição ao PVS2 por 2 horas, nova desidratação foi observada, com um ganho de volume nos tecidos das partes

1 e 2, provavelmente pela maior penetração de componentes crioprotetores nessas partes, comparando às demais estudadas.

Nesse sentido, o objetivo deste capítulo foi investigar as possíveis alterações celulares ocorridas durante o procedimento de vitrificação em *A. angustifolia*. Os resultados deste trabalho adicionam informações importantes para o estabelecimento de um protocolo de criopreservação, para o entendimento de como a recalcitrância dos embriões afetam as tentativas da redução de metabolismo dos mesmos. Estes resultados visam à obtenção de metodologias alternativas que permitam a conservação de diferentes sistemas vegetais, mais especificamente espécies recalcitrantes, por um longo período de tempo.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Material vegetal

Foram avaliados embriões de *A. angustifolia* maturos frescos (controle) e submetidos às diferentes etapas de vitrificação como técnica de vitrificação, descrita em detalhe no item 3.2.1.2. do **CAPÍTULO 3** e resumidos abaixo (Fig. 4.1.):

- A: 16 horas em meio WPM acrescido de 2M de sacarose;
- **B**: 16 horas em meio acrescido de 2M de sacarose seguido de 2 horas em PVS2;
- C: direta imersão em NL;
- **D**: 16 horas em meio acrescido de 2 M de sacarose seguido de 2 horas em PVS2, mergulho em NL e recuperação em meio de cultura WPM contendo 1,2 M de sacarose.

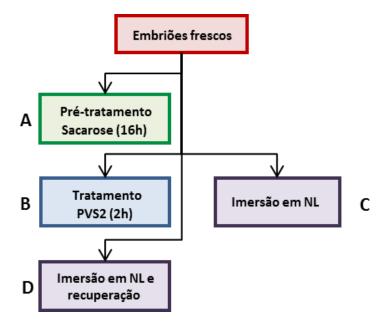


Fig. 4.1. Amostras de *A. angustifolia* após as etapas do procedimento de vitrificação, utilizadas para as avaliações histológicas. PVS2: *Plant Vitrification Solution 2*, NL: Nitrogênio Líquido.

4.2.2 Metodologias

4.2.2.1 <u>Avaliação histológica</u>

4.2.2.1.1 Análise do embrião inteiro

Embriões de *A. angustifolia* maturos e submetidos aos diferentes tratamentos (conforme item anterior) foram fixados em FAA (formalina, ácido acético e álcool etílico 50%) por 24 horas (JOHANSEN, 1940) e FNT (formalina neutra tamponada) em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 (LILLIE, 1965) por 48 horas e estocados em álcool etílico 70%. A seguir, o material foi , desidratado em série etílica, incluídos em resina plástica (Historesin Leica; (GERRITS, 1991)), seccionados com 20 µm de espessura e corados com azul de toluidina 0,05% (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964) em tampão acetato (pH 4,7). Esses materiais também foram utilizados para a detecção de amido através de coloração com o reagente de Lugol (JOHANSEN, 1940). As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Leica DMLB com câmera digital acoplada.

4.2.2.1.2 Análise da organização e aspecto das estruturas celulares

Embriões foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2 (COETZEE; VAN DER MERWE, 1985). A seguir, foram seccionados em cinco partes, desidratados em série cetônica de concentrações crescentes e incluídos em resina de baixa viscosidade do tipo Spurr (SPURR, 1969). Secções semifinas com 0,5 µm de espessura foram obtidas em ultramicrótomo utilizando-se navalha de vidro. Essas secções foram coradas com azul de toluidina 0,05% e as observações e registros de imagens foram realizados em microscópio de luz.

As imagens de microscopia de luz, ao longo das etapas do protocolo de vitrificação, foram então comparadas com as imagens dos embriões frescos, recémretirados das sementes (controle).

4.3 Resultados e discussão

As imagens obtidas através da microscopia de luz do embrião maturo inteiro de *A. angustifolia*, permitiram a visualização dos meristemas vegetais, ao longo das diferentes partes estudadas (1 a 5). A partir da fig. 2, pode-se destacar, em **a**, sob coloração com azul de toluidina, as principais estruturas anatômicas do embrião como coifa, ápice radicular, porção distal do hipocótilo, porção proximal do hipocótilo e plúmula e cotilédones. Em **b**, a coloração com o reagente de Lugol permitiu a observação da distribuição dos grãos de amido, contidos nos amiloplastos, ao longo do eixo embrionário, bem como nos cotilédones. Destaca-se a presença do amido em menor quantidade na PM e coifa em na parte 1, em **c** e no procâmbio em **d**, grande quantidade na protoderme em **e** e na plúmula em **f**. A partir da distribuição dos amiloplastos descrita, percebe-se uma gradação na quantidade de amido ao longo do comprimento do embrião, apresentando maior concentração nas regiões 3 e 5 (hipocótilo e cotilédones).

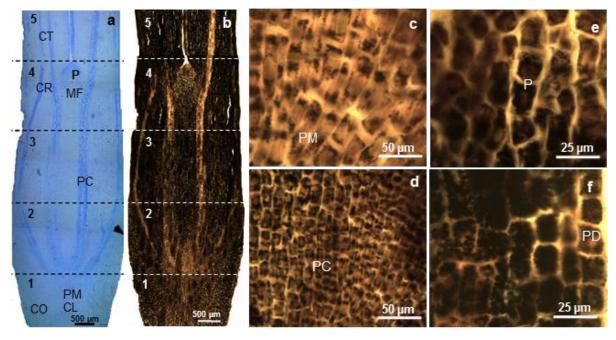


Figura 4.2. Microscopia de luz do embrião maturo de *A. angustifolia* inteiro, seccionados longitudinalmente, com os cotilédones e coifa parcialmente removidos, (a e b) e o detalhamento das diferentes partes estudadas (1, 2, 3, 4 e 5). Em **a**, o material foi corado com azul de toluidina 0,05% e nas demais imagens, reagente de Lugol. Em destaque, a presença de grãos de amido na parte 1 em **c**, na parte 2 em **d**, na parte 3 em **e** e na parte 5 em **f**. CT: cotilédones, P: plúmula, MF: meristema fundamental, CR: canal resinífero, PD: protoderme, PC: procâmbio, PM: promeristema, CL: columela, CO: coifa.

O aspecto das estruturas celulares nos diferentes tratamentos está ilustrado na figura 4.3 (controle) e na figura 4.4 (tratamentos). No material controle, puderam ser observadas diferenças no padrão celular observado ao longo do embrião. A parte1 do embrião apresentou células mais arredondadas e afastadas entre si (Fig. 4.3.a e b), além de um maior número de células mortas do que nas partes de 2 a 5 (Fig. 4.3.c, d, e, e f). Estas, por outro lado, possuíam células de formato mais justaposto, sem a presença de espaços entre si. As células mortas ou em degeneração foram reconhecidas pelo alto conteúdo de compostos fenólicos, identificados pela coloração escurecida e levemente esverdeada no protoplasto, como pode ser observado, por exemplo, na Fig. 4.3b. Tais células foram mais frequentemente identificadas nas porções mais periféricas da coifa, onde ocorre descamação celular. Ao longo de todo o embrião, os núcleos celulares, apresentavam nucléolo proeminente e ausência de heterocromatina visível (Fig. 4.3c).

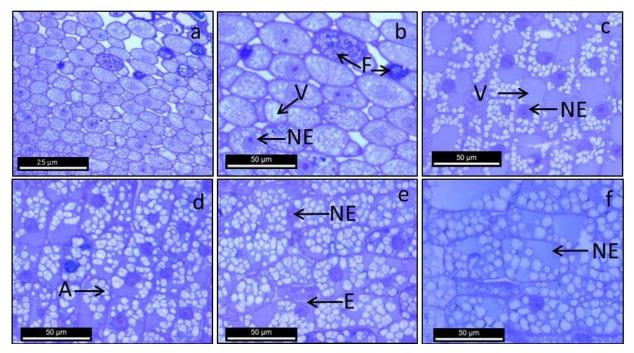


Figura 4.3. Microscopia de luz das diferentes partes (1 a 5) de embriões de *A. angustifolia* frescos (controle) em cortes semi-finos longitudinais. **a)** espaçamento das células da coifa na parte 1; **b)** Vacúolos de tamanho reduzido, presença de compostos fenólicos nas células e nucléolo evidente na parte 1; **c)** vacúolos de tamanho elevado e nucléolos evidentes na parte 3; **d)** Grãos de amido de grande tamanho na parte 3; **e)** núcleo com nucléolo evidente e espaços intercelulares estreitos na parte 4; **f)** vacúolo de elevado tamanho na parte 5. V: vacúolo, NE: nucéolo, CM: célula morta ou em degeneração, E: espaço intercelular, F: compostos fenólicos, A: grãos de amido nos amiloplastos.

Os embriões expostos às diferentes etapas do procedimento de criopreservação (A, B, D), ou diretamente mergulhados em nitrogênio líquido (C), apresentavam um grande número de células mortas (CM) nas partes 2-5 (Fig. 4.4b, d, e, f, g, j e l). Ressalta-se que estas células foram identificadas em pequena quantidade no material controle (Fig. 4.3). Nas células citadas, os compostos fenólicos, quando não preenchiam todo o lume celular, encontravam-se dispersos entre os grãos de amido que, frequentemente, apresentavam-se em tamanho reduzido (Fig. 4.4a, f, g e k). Além disso, os núcleos possuem muitas regiões de heterocromatina (Fig. 4.4a, h e j). Espaçamento entre as células foram observados nos diferentes tratamentos em todo o embrião. (Fig. 4.4b, c, d, e, h e j), sendo que os embriões submetidos a todos os procedimento de criopreservação (D), apresentaram os espaçamentos mais frequentes e visivelmente mais largos (Fig. 4.4j e l). Ressalta-se que, neste tratamento, embriões viáveis não puderam ser obtidos.

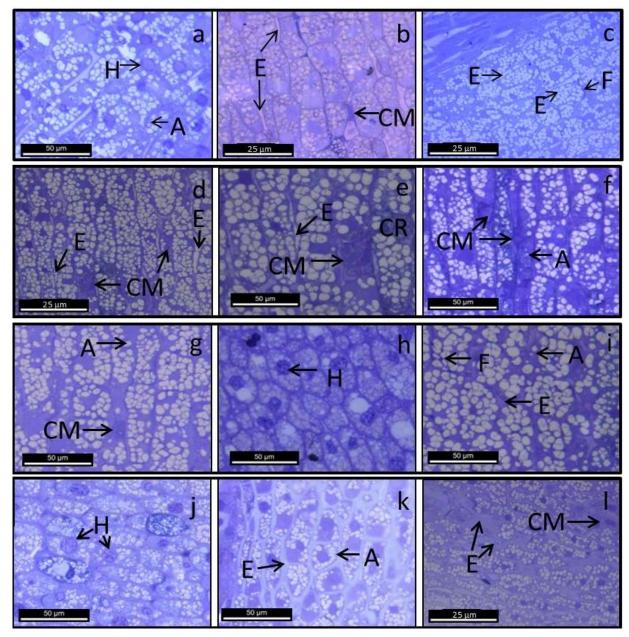


Fig 4.4 Microscopia de luz das diferentes partes dos embriões de *A. angustifolia* em cortes semi-finos após as diferentes etapas dos tratamento de criopreservação. Grãos de amido (A) de tamanho reduzido, espaçamentos entre as células (E) após o pré-tratamento com sacarose em a) parte 3, b) e c) partes 4; após tratamento com PVS2 em d) parte 3, e) e f) parte 5; após direta imersão em g) parte 3, h) parte 1 e i) partes 4; e após pré-tratemento e tratamento com crioprotetores, imersão em NL e recuperação em j) parte 1, k) e l) parte 3.

Os espaçamentos observados entre as células podem ser causados pela perda de adesão entre as mesmas tanto pela perda dos componentes da mesma ao longo do processo de criopreservação ou pela retração que ocorre com a morte celular. A adesão entre as células vegetais está diretamente associada à presença de pectina, substância que compõe a lamela média e que também é abundante nas

paredes celulares (MICHELI, 2001), além das conexões citoplasmáticas, que podem ser perdidas pela retração do protoplasto, em relação à parede celular (plasmólise) (HELLIOT et al., 2003). A morte celular programada (MCP), por sua vez, em plantas, é considerada um importante processo do desenvolvimento (KURIYAMA; FUKUDA, 2002), além de um mecanismo de defesa contra patógenos (LAM, 2004). Em nível molecular, é caracterizada pela ativação de enzimas proteolíticas e fragmentação de DNA nuclear (DOMÍNGUEZ; MORENO; CEJUDO, 2012). Nas raízes, a MCP é regulada por etileno e ocorre naturalmente na coifa, provendo proteção e oxigênio para o tecido em crescimento (DOMÍNGUEZ; MORENO; CEJUDO, 2012). Em milho (*Zea mays*), a formação de aerênquima está relacionada com a MCP, regulada pelo etileno e desencadeada pela atuação de fenóis que, vacúolos, diferenciação, estocados em durante processo de são descompartimentalizado e oxidado causando a morte das células e promovendo a lignificação e suberização das mesmas. Quando há infecção ou lesões, tais compostos fazem com que o tecido vegetal seja vedado. Em caso de estresse prolongado, são capazes de promover uma cascata metabólica nas células periféricas, mediada pelo acúmulo de ácido indolacético e etileno, produzindo defesa peridermal em profundidade (DREW; HE; MORGAN, 2000). Portanto, a presença de grande quantidade de compostos fenólicos para os embriões de A. angustifolia poderia estar relacionado com a degeneração das células observada no presente trabalho.

Dessa forma, a presença de células mortas ou em degeneração no embrião, com exceção da coifa, além da perda de conexão entre os estratos celulares, observados no presente trabalho, sobretudo durante o tratamento após a recuperação do material (D), poderia estar associada às injúrias provocadas pelos diferentes tratamentos utilizados para a criopreservação. Esta situação é frequentemente observada em sistemas onde a criopreservação já é realizada com sucesso. Assim, estudos da ultraestrutura, em células meristemáticas de banana, evidenciaram a desintegração dos componentes celulares e o derrame de compostos fenólicos, que foram associados a danos celulares durante o procedimento de criopreservação (HELLIOT et al., 2003). Em células ápice apical de batata (*S. tuberosum*) criopreservadas, observou-se que exposição prolongada ao

PVS2 provocou a redução do tamanho de vesículas celulares, que se tornaram mais numerosas. Além disso, as mitocôndrias e cloroplastos se multiplicaram e os vacúolos tomaram um formato irregular. Dois dias após a recuperação dos ápices, sinais de danos celulares como ruptura da membrana plasmática, plasmólise, destruição das organelas celulares e forte heterocromatização do núcleo puderam ser registrados (KACZMARCZYK, 2008). Ressalta-se que, em *A. angustifolia*, os embriões mantiveram—se viáveis nos tratamentos em que não envolviam a imersão em nitrogênio líquido. Ou seja, as etapas de pré-tratamento em solução de sacarose, bem como exposição ao PVS2, apesar de estressantes, de acordo com os danos observados, não foram suficientes para comprometer a viabilidade dos embriões. Por outro lado, também não foram capazes de proteger as células contra as injúrias causadas pela imersão em nitrogênio líquido, fato envidenciado quando comparadas com a direta imersão em nitrogênio liquido.

Durante a criopreservação, injúrias por congelamento podem ocorrer durante o resfriamento ou durante o reaquecimento, na etapa de recuperação, pela das moléculas água (MAZUR: KOSHIMOTO, reorganização da Anormalidades ou injúrias podem ocorrer de forma diferenciada de acordo com o tipo de células pertencentes a um mesmo sistema submetido aos procedimentos de criopreservação. Quanto mais vacuolizada é uma célula vegetal, maior é a quantidade de água que deve ser retirada da mesma, evitando-se assim, a formação letal de cristais de gelo. Nesse sentido, o sucesso da criopreservação estaria mais diretamente relacionado à indução de tolerância à desidratação do que a tolerância ao resfriamento em si (HELLIOT et al., 2003). De acordo com os autores, uma maior destruição de células altamente vacuoladas, comparadas a aquelas menos vacuoladas, foram registradas durante a criopreservação em Musa spp, de forma que apenas um número limitado de estratos celulares, localizados nos primórdios foliares, permaneceram vivos após a criopreservação.

A desidratação, por outro lado, também pode ser danosa dependendo da intensidade de plasmólise induzida. A plasmólise severa pode provocar a total perda da conexão entre células vizinhas, que ocorre através dos plasmodesmos (HELLIOT et al., 2003). Dentre os procedimentos utilizados para a desidratação prévia ao resfriamento, destaca-se a vitrificação, no qual células entram em contato com

soluções que combinem altas concentrações de crioprotetores penetrantes (dimetilsulfóxido e glicerol) e não penetrantes, que por sua vez, são osmoticamente ativos (etilenoglicol e sacarose). Assim, a exposição a esta solução tem dupla função. Ou seja, permite a saída de água das células, preenchendo com soluções não congelantes, de forma que, ao serem imersas em nitrogênio liquido, as células alcancem um estado vítreo, sem que, no entanto, ocorra a formação de cristais de gelo (SAKAI, 2000). Portanto, apesar de se mostrar necessária para o congelamento, o procedimento de desidratação pelo PVS2 (C) pode ter influenciado no aumento dos espaçamentos observados após os tratamentos nos embriões de *A. angustifolia.* Além disso, durante a recuperação (D), que envolve a manutenção do material sob rotação em meio de cultura, pode ter sido enfraquecido ainda mais as ligações intercelulares nos embriões. É possível também, que por esta razão, o tratamento de direta imersão no nitrogênio líquido causou menos espaçamentos entre as células do que aqueles em que os embriões entraram em contato com sacarose, PVS2, NL e recuperação (D).

Como coadjuvante do processo acima descrito, existem os pré-tratamentos com soluções contendo açúcares. Neste procedimento, a concentração de crioprotetores é menor, e as células permanecem em contato com a mesma por um período de tempo mais longo do que a solução vitrificante, simulando uma aclimatação à criopreservação. Neste caso, a saída de água das células seria mais lenta e, portanto, com menor estresse osmótico. Além disso, os açúcares presentes na solução auxiliariam na estabilização da bicamada lipídica da membrana celular, bem como de suas proteínas, sob temperaturas criogênicas (HELLIOT et al., 2003). Tal estabilidade estaria relacionada com a habilidade dos mesmos em formar pontes de hidrogênio com as cabeças polares da membrana fosfolípidica ainda em estado hidratado (CROWE et al., 1987).

Todos os tecidos do embrião de *A. angustifolia* avaliados apresentavam grãos de amido preenchendo quase que totalmente o interior do protoplasto, sendo visualmente mais abundantes no hipocótilo e nos cotilédones (Fig. 4.3), tecidos relacionados ao armazenamento de susbtâncias.

Uma grande quantidade de amiloplastos em todos os tecidos embriogênicos de *A. angustifolia*, sobretudo nas regiões meristemáticas, incluindo o meristema

apical caulinar e a protoderme, é incomum quando comparamos com outros sistemas vegetais, inclusive as coníferas. Embriões de *Pinus pinaster* apresentam baixas concentrações de amido, mesmo nos estádios mais tardios do desenvolvimento, com maior concentração de grãos de amido na coifa e na columela, e a presença de alguns grãos de amido nos cotilédones e região lateral do hipocótilo (TERESO et al., 2007). Localização semelhante de amiloplastos foi observada ao longo do embrião de *Picea glauca* (JOY et al., 1991). *Araucaria araucana*, por outro lado, apresenta 31% da massa seca do embrião em amido, no interior dos amiloplastos (WAGHORN et al., 2003). Algumas espécies de angiospermas, entretanto, como, *Zea mays* e *Allium cepa* apresentam grãos de amido em células meristemáticas (revisado em ROGGE-RENNER et al., 2012). Além de numerosos, os grãos de amido em *A. angustifolia* são grandes, variando entre 10 e 25 μm de diâmetro, de acordo com estudo anterior (BELLO-PÉREZ et al., 2006)

Os grãos de amido são estruturas complexas. Seu tamanho e forma dependem da espécie, linhagem, estádio de desenvolvimento, hidrólise e condições ambientais (WAGHORN et al., 2003). Estudos desse componente de reserva são bastante antigos. Um dos primeiros relatos sobre a localização da enzima fosforilase, associando à distribuição da reserva amilácea na semente, foi realizada em soja (Glycine max) por Yin e Sun (1949). De acordo com os autores, o amido estaria relacionado aos tecidos de crescimento ativo como uma reserva alimentar temporária para células em desenvolvimento. Detectado durante o início do processo germinativo, a sua síntese estaria mais ativa na coifa, dentre os tecidos da radícula, e menos ativa nas folhas jovens. Nesse sentido, é provável que a presença de amido em tecidos não usuais, como protoderme e meristemas apical e caulinar, como verificado nos embriões de A. angustifolia, indicaria uma estratégia de manutenção das altas taxas metabólicas, ainda não registrada em sementes recalcitrantes. O acúmulo intenso de reserva energética nestes tecidos garantiria a manutenção de altas taxas metabólicas durante o desenvolvimento do embrião em plântula. No entanto, tal acúmulo pode estar sendo prejudicial às tentativas de criopreservá-los.

A presença dos grãos de amido dificulta o processo de criopreservação em decorrência da alta capacidade hidratante dos grãos, retendo umidade dentro da

matriz do açúcar. Apesar de seus grânulos serem insolúveis em água fria, podem reversivelmente, absorver água, devido à presença de grupos hidroxila. No entanto, quando a temperatura é elevada, as moléculas de amido vibram mais vigorosamente, quebrando as ligações intermoleculares e permitindo absorver maior quantidade de moléculas de água. Suas propriedades físicas vão depender da composição química, como proporção de amilose em relação à amilopectina em sua estrutura (revisado por HENRÍQUEZ et al., 2008). Sementes de *A. angustifolia* contém amido com alta capacidade de absorver água fria, comparado com amido proveniente de outras plantas como o da mandioca (*Manihot esculenta*) (WOSIACKI; CEREDA, 1985). Dessa forma, o amido presente nas células de *A. angustifolia* poderia dificultar a perda de água durante as etapas de desidratação prévias ao congelamento, neste caso, a vitrificação, aumentando o estresse fisiológico sofrido pelas células deste sistema durante o procedimento de criopreservação.

A observação de maior conteúdo de água na coifa, seguida pela radícula, nos embriões frescos, acompanhada por maior velocidade de perda de água e maior absorção de crioprotetores, observada nos resultados do CAPÍTULO 3 deve estar relacionada com a quantidade de amido presentes nestas regiões. Assim, células com menor quantidade de amido, apresentariam uma menor resistência à perda de água, ao mesmo tempo em que permitiriam uma maior entrada de crioprotetores (provavelmente DMSO e glicerol), quando comparadas às demais regiões estudadas. A substituição da água pelo preenchimento das células poderia reduzir a plasmólise auxiliando a manutenção da integridade física e metabólica das membranas. Tal hipótese é apoiada pela avaliação das estruturas celulares, na qual a (coifa) foi a menos injuriada pelo tratamento que se mostrou mais danoso (Fig. 4.4(1)). Ao mesmo tempo, a maior resistência ao contato de PVS2 pode estar relacioanada à dificuldade de penetração do crioprotetor. Ao mesmo tempo, a presença da solução nos espaços intercelulares pode ter contribuído com a perda de conexão entre as células e assim, a morte das mesmas.

Com relação à redução do tamanho dos grãos de amido observada após os tratamentos, sugere-se que seja decorrente da digestão dos mesmos, realizada de forma não programada, mas sim, pela sua degeneração, após os tratamentos. Em *Araucaria araucana*, a digestão dos grãos de amido ocorre através de enzimas

específicas, de acordo com as necessidades energéticas dos embriões e plântulas em crescimento (WAGHORN et al., 2003). Por outro lado, a hidrólise do amido, *in vitro*, pode ocorrer por uma variedade de enzimas, sem distinção e é evidenciada pela alteração morfológica causada pela degradação diferenciada do grão (CARDEMIL; VARNER, 1984). Nesse sentido, o rompimento das membranas durante o tratamento de criopreservação de *A. angustifolia* no presente trabalho, promoveria o contato dos grãos de amido, contidos nos amiloplastos, com o conteúdo celular, que contendo enzimas, promoveria a hidrólise do amido, reduzindo o tamanho dos grãos. Além disso, o rompimento das membranas resulta em um processo de morte celular que tem como subproduto, compostos fenólicos.

Conclui-se, portanto, que, ao longo do eixo embrionário e cotilédones de *A. angustifolia* apresenta um gradiente tanto morfológico quanto fisiológico, com diferenças nas respostas aos diferentes tratamentos ao longo do processo de criopreservação. Dessa forma, a complexidade física e fisiológica do embrião foi responsável por inviabilizar o sucesso na obtenção de um protocolo de criopreservação para manter a viabilidade nos diferentes tecidos dos embriões de *A. angustifolia*, já que as partes que sofreram maiores danos são interligadas com o restante, e contêm regiões meristemáticas importantes para o desenvolvimento do embrião em plântula. Adicionalmente, a grande quantidade de grãos de amido estaria relacionada tanto com a absorção dos crioprotetores quanto com a ocorrência de danos às membranas celulares no embrião neste sistema vegetal, fato que inviabilizou a obtenção de um protocolo de sucesso.

CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERS	SPECTIVAS

A utilização da criopreservação, embora reconhecida como estratégia fundamental para a obtenção e estruturação de bancos de germoplasma ex situ, não tem sido amplamente explorada no Brasil e, considerando as espécies arbóreas nativas recalcitrantes, como é o caso de A. angustifolia, a pesquisa desenvolvida no presente trabalho é inédito no país. Sendo uma conífera de importância tanto econômica quanto ecológica e, devido à necessidade de aumento de conhecimento a respeito do tema, ainda bastante empírico para o alcance de protocolo de sucesso, optou-se pela investigação de diferentes aspectos fisiológicos, químicos e físicos, a fim de obter conhecimentos básicos para fundamentar e conduzir estudos pontuais a cerca do tema como identificação e avaliação de marcadores biológicos e tolerância à dessecação durante o processo, além de sugestões sobre estratégias de metodologia de criopreservação para a espécie estudada.

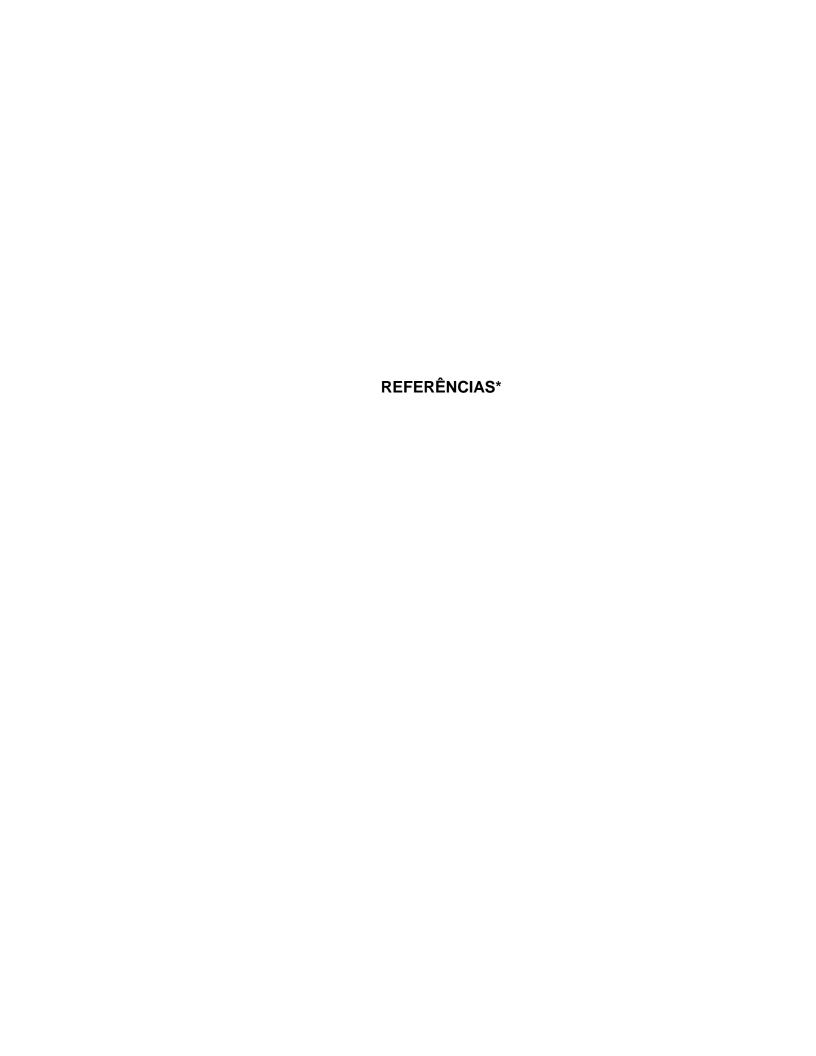
No presente trabalho foi possível o estabelecimento de um protocolo de criopreservação para células embriogênicas de *Araucaria angustifolia*, como base para o desenvolvimento de bancos de germoplasma em longo prazo. Ressalta-se que as células, por mostrarem-se capazes de adquirir a capacidade de tolerância à dessecação e resfriamento, mesmo pertencendo a uma espécie com sementes recalcitrantes, abrem a perspectiva para estudos comparativos fisiológicos entre os diferentes sistemas de uma mesma espécie sobre o tema. Além disso, por trazer informações inéditas sobre os padrões de variação dos reguladores vegetais durante a criopreservação em espécies recalcitrantes, pode-se utilizar a espécie em estudo como modelo para estudos da criopreservação em plantas sensíveis à desidratação.

A dificuldade em se obter um protocolo de criopreservação dos embriões zigóticos de *A. angustifolia* levou ao questionamento de fatores físico-químicos que impediriam tal sucesso. Provavelmente, o grande tamanho do embrião e a presença massiva de grãos de amido que retém umidade, são fortes candidatos aos fatores que impediram sua criopreservação, já que para o alcance de redução de água necessária ao resfriamento não danoso ao tecido exigem tratamentos com diferentes condições estressantes por tempo prolongado, afetando a recuperação do material. Nesse sentido, um melhor entendimento físico e fisiológico do procedimento de criopreservação em sistemas sensíveis à dessecação foi obtido. Além disso, devido ao

elevado tamanho do embrião zigótico de *A. angustifolia*, estudos a cerca de como os crioprotetores mais comumente utilizados em plantas atuariam nas diferentes células e tecidos, sobretudo em sistemas sensíveis à dessecação, foram realizados de forma inédita. O uso do sistema como modelo de estudos para a criopreservação também permitiu a visualização dos danos decorrentes de cada etapa e como o conteúdo celular poderia influenciar na penetração e atuação dos crioprotetores, assunto que ainda é alvo de discussão neste tópico.

A fim de se investigar de forma mais detalhada os danos físicos causados aos tecidos e de acordo com estudos já realizados para outros sistemas, estudos da ultraestrutura do material permitindo a visualização das membranas celulares, bem como a situação das organelas, vesículas e vacúolos, ao longo do procedimento de criopreservação, é sugerida. Além disso, o perfil das variações dos compostos endógenos produzidos pelos embriões zigóticos ao longo do procedimento poderia ser avaliado, e comparado aos perfis obtidos para as culturas celulares, permitindo a comparação dos fatores fisiológicos dos dois sistemas diferentes em uma mesma espécie vegetal.

Diante do exposto, recomenda-se para a construção de um banco de germoplasma ex situ para o sistema A. angustifolia ou outros sistemas com sementes sensíveis à perda de água, a conservação de tecidos e células, com utilização de técnicas in vitro, como alternativa à conservação de suas sementes, é recomendada. Como sugestão à novas tentativas de criopreservação dos eixos embrionários, estudos utilizando-se o material em processo germinativo avançado e, portanto, com menor conteúdo de grãos de amido (que impedem a retirada de água com eficiência) e maior concentração de açúcares de cadeia mais curta (crioprotetores naturais) são recomendados. A utilização de outros materiais como os ápices caulinares seguido de microestaquia, que apresenta a possibilidade de se criopreservar clones de interesse, também deve ser considerada.



REFERÊNCIAS*

ALCÁZAR, R. et al. Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 23, p. 1867–1876, 2006.

ALCÁZAR, R. et al. Integration of polyamines in the cold acclimation response. **Plant Science: an international journal of experimental plant biology**, v. 180, n. 1, p. 31–38, 2011.

ALLEN, T. E. The storage of fowl semen at low temperatures. 1956. p. 118–119.

ÁLVAREZ, J. M.; CORTIZO, M.; ORDÁS, R. J. Cryopreservation of somatic embryogenic cultures of *Pinus Pinaster*: effects on regrowth and embryo maturation. **CryoLetters**, v. 33, n. 6, p. 476–484, 2012.

ANCHORDOGUY T. Cryoprotectant mechanism of DMSO into phospholipids layer. **Cryobiology**, v. 28, p. 467–473, 1991.

ANSARI, M. S.; RAKHA, B. A. Effect of exogenous glutathione in extender on the freezability of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. **Animal Science Papers and Reports** v. 28, n. 3, p. 235–244, 2010.

ARNOLD, V. et al. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell Culture and Tissue**, v. 69, p. 233–249, 2002.

ASTARITA, L.; GUERRA, P. M. Early somatic embryogenesis in Araucaria angustifolia–induction and maintenance of embryonal-suspensor mass cultures. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 10, p. 113–118, 1998.

ASTARITA, L. V; HANDRO, W.; FLOH, E. N. Y. I. S. Changes in polyamines content associated with zygotic embryogenesis in the Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O . Ktze . **Revista Brasileira de Botânica**, v. 2, p. 163–168, 2003.

BAEK, K.-H. Production of reactive oxygen species by freezing stress and the protective roles of antioxidant enzymes in plants. **Journal of Agricultural Chemistry and Environment**, v. 1, n. 1, p. 34–40, 2012.

BAJAJ, Y. P. S. Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Cryopreservation of plant germplasm I.** Berlim: Springer, 1995. p. 3–28.

_

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- BAKHT, J.; BANO, A.; DOMINY, P. The role of abscisic acid and low temperature in chickpea (*Cicer arietinum*) cold tolerance. II. Effects on plasma membrane structure and function. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 14, p. 3707–315, jan. 2006.
- BALLESTEROS, D.; WALTERS, C. Calorimetric properties of water and triacylglycerols in fern spores relating to storage at cryogenic temperatures. **Cryobiology**, v. 55, n. 1, p. 1–9, ago. 2007.
- BARON, K.; STASOLLA, C. The role of polyamines during in vivo and in vitro development. In Vitro Cellular & Developmental Biology, v. 44, n. 5, p. 384–395, 2008.
- BECWAR, M.; WANN, S.; JOHNSON, M. Development and characterization of in vitro embryogenic systems in conifers. **IPC Technical paper series**, n. 258, p. 1–17, 1987.
- BELLO-PÉREZ, L. A. et al. Isolation and Characterization of Starch from Seeds of *Araucaria brasiliensis*: A Novel Starch for Application in Food Industry. **Starch Stärke**, v. 58, n. 6, p. 283–291, jun. 2006.
- BENSON, E. E. Cryopreservation of Shoot-Tips and Meristems. In: **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**. [s.l: s.n.]. p. 121–132.
- BENSON, E. E. et al. Physiological markers in woody plant germplasm cryopreservation. **Cryobiology**, v. 53, n. 3, p. 400, 2006.
- BENSON, E.; LYNCH, P.; JONES, J. The detection of lipid peroxidation products in cryoprotected and frozen rice cells: consequences for post-thaw survival. **Plant Science**, v. 85, p. 107–114, 1992.
- BENSON, J. D. et al. The cryobiology of spermatozoa. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1682–99, 2012.
- BERJAK, P. et al. Recalcitrant (homoiohydrous) seeds: the enigma of their desiccation-sensitivity. **Seed Science and Technology**, v. 18, p. 297–310, 1990.
- BERJAK, P.; MYCOCK, D. Calcium, with magnesium, is essential for normal seedling development from partially dehydrated recalcitrant axes: a study on *Trichilia dregeana* Sond. **Seed Science Research**, v. 14, n. 2, p. 217–231, 2004.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 22–55, 2000.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. Recalcitrant seeds. In: BENECH-ARNOLD, R.; SÁNCHEZ, R. (Eds.). **Handbook of Seed Physiology. Applications to Agriculture**. New York: Food Product Press and Haworth Reference Press, 2004. p. 305–317.

- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From Avicennia to Zizania: Seed Recalcitrance in Perspective. **Annals of Botany**, v. 101, p. 213–228, 2008.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W.; VERTUCCI, C. Homoiohydrous (recalcitrant) seeds: Developmental status, desiccation sensitivity and the state of water in axes of Landolphia kirkii Dyer. **Planta**, v. 186, n. 2, p. 249–261, 1992.
- BERJAK, P.; VERTUCCI, C.; PAMMENTER, N. Effects of developmental status and dehydration rate on characteristics of water and desiccation-sensitivity in recalcitrant seeds of *Camellia sinensis*. **Seed Science Research**, v. 3, p. 155–166, 1993.
- BILAVCÍK, A.; ZÁMECNÍK, J.; FALTUS, M. The use of differential scanning calorimetric analysis of plant shoot tips in cryopreservation. **COST**, v. 871, p. 26–27, 2007.
- BOUCHEREAU, A et al. Polyamines and environmental challenges: recent development. **Plant Science**, v. 140, n. 2, p. 103–125, jan. 1999.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BRAVO, L. A. et al. The role of ABA in freezing tolerance and cold acclimation in barley. **Physiologia Plantarum**, v. 103, n. 1, p. 17–23, 1998.
- BURKE, M. J. The glassy state and survival of anhydrous biological systems. In: LEOPOLD, A. C. (Ed.). **Membrane, metabolism and dry organisms**. Ithaca: Cornell University Press, 1986. p. 358–364.
- CARDEMIL, L.; VARNER, J. E. Phosphorylase activity and sucrose translocation of the pinon seed of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O.Ktze. **Plant Physiology** 76:1047-54., v. 76, p. 1047–1054, 1984.
- CARVALHO, P. E. R. *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze: Pinheiro-do-Paraná. In: CARVALHO, P. E. R. (Ed.). **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA-CNPF, 1994. p. 70–78.
- CASSELLS, A. C.; CURRY, R. F. Oxidative Stress And Physiological, Epigenetic And Genetic Variability In Plant Tissue Culture: Implications For Micropropagators And Genetic engineers,. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 64, p. 145–157, 2001.
- CATALÁ, R.; MEDINA, J.; SALINAS, J. Integration of low temperature and light signaling during cold acclimation response in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 39, p. 16475–16480, 2011.

- CHEN, T. H. et al. Freezing Characteristics of Cultured *Catharanthus roseus* (L). G. Don Cells Treated with Dimethylsulfoxide and Sorbitol in Relation to Cryopreservation. **Plant Physiology**, v. 75, n. 3, p. 720–725, 1984.
- CHENG, Y. et al. New changes in the plasma-membrane-associated proteome of rice roots under salt stress. **Proteomics**, v. 9, n. 11, p. 3100–3114, 2009.
- CHETVERIKOVA, E. P. Dehydration in cryopreservation of moist plant tissues and seed maturation. **Biophysics**, v. 53, n. 4, p. 304–307, 2009.
- CHIN, H.; ROBERTS, E. **Recalcitrant crop seeds**. Kuala Lumpur: Tropical Press, 1980.
- CLEGG, J. S. The physical properties and metabolic status of Artemia cysts at low water contents: The Water Replacement Hypothesis. In: LEOPOLD, A. C. (Ed.). **Membranes, metabolism and dry organisms**. Ithaca: Comstock Publishing Associates, 1986. p. 169–187.
- COETZEE, J.; VAN DER MERWE, C. F. Penetration rate of glutaraldehyde in various buffers into plant tissue and gelatin gels. **Journal of Microscopy**, v. 137, p. 129–136, 1985.
- CROWE, J.; CROWE, L. Stabilization of membranes in anhydrobiotic organisms. In: LEOPOLD, A. (Ed.). **Membranes, metabolism and dry organisms**. Ithaca: Comstock Publ Assoc, 1986. p. 188–209.
- CROWE, J. H. et al. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **The Biochemical Journal**, v. 242, n. 1, p. 1–10,1987.
- CUEVAS, J. C. et al. Putrescine is involved in Arabidopsis freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature. **Plant Physiology**, v. 148, n. 2, p. 1094–105, 2008.
- CUI, S. et al. A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. **Proteomics**, v. 5, p. 3162–3172, 2005.
- CUTLER, S. et al. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. **Annu Rev Plant Biol 6**, v. 61, p. 651–679, 2010.
- DAIE, J.; CAMPBELL, W. Response of Tomato Plants to Stressful Temperatures. **Plant Physiology**, v. 67, n. 1, p. 26–29, 1981.
- DAVIS, D. et al. Assisted Reproductive Technology: Laboratory Aspects. In: FALCONE, T.; HURD, W. (Eds.). **Assisted reproductive technology: laboratory aspects**. Philadelphia: Mosby, 2007. p. 900.
- DEGAND, H. et al. Proteomic analysis of chicory root identifies proteins typically involved in cold acclimation. **Proteomics**, v. 9, n. 10, p. 2903–2907, 2009.

DELLEDONNE, M. et al. Signal Interactions Between Nitric Oxide And Reactive Oxygen Intermediates In The Plant Hypersensitive Disease Resistance Response. **PNAS**, v. 98, n. 23, p. 13454–13459, 2001.

DELLEDONNE, M. NO News Is Good News For Plants. **Current Opinion In Plant Biology**, v. 8, n. 4, p. 390–396, 2005.

DEREUDDRE, J. et al. Resistance of alginate- coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to desiccation and freezing in liquid nitrogen: 2. thermal analysis. **CryoLetters**, v. 12, p. 135–148, 1991.

DESIKAN, R.; HANCOCK, J. T.; NEILL, S. J. Oxidative stress signalling. In: HIRT, H.; SHINOZAKI, K. (Eds.). **Plant Responses to Abiotic Stress**. Heidelberg: Springer, 2004. p. 301.

DEVRIES, A. Antifreeze glycoproteins and peptides: interactions with ice and water. **Meth Enzymol**, v. 127, p. 293–303, 1986.

DEVRIES, A. L.; KOMATSU, S. K.; FEENEY, R. E. Chemical and physical properties of freezing point-depressing glycoproteins from Antarctic fishes. **Journal of Biochemistry**, v. 245, p. 2901–2908, 1970.

DIAS, L. L. C. et al. Polyamines, amino acids, IAA and ABA contents during. **Seed Science and Technology**, v. 37, p. 42–51, 2009.

DOMÍNGUEZ, F.; MORENO, J.; CEJUDO, F. J. The scutellum of germinated wheat graisn undergoes programed cell death: identification of an acid nuclease involved in nucleus dismantling. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 15, p. 5475–5485, 2012.

DOS SANTOS, A. L. et al. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia*. **Biologia Plantarum**, v. 52, n. 1, p. 195–199, 2008.

DREW, M. C.; HE, C. J.; MORGAN, P. W. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. **Trends in plant science**, v. 5, n. 3, p. 123–127, 2000.

DUMET, D.; BENSON, E. E. The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduced cryopreservation-induced damage in hydrate desiccated plant germoplasm. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Eds.). **Cryopreservation of tropical plant germoplasm**. [s.l.] IPGRI, 2000.

ENGELMANN, F. In vitro conservation of tropical plant germoplasm. **Euphytica**, v. 57, p. 227–243, 1991.

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

- ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: Progress and prospects. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant, v. 40, n. 5, p. 427–433, set. 2004.
- EVANS, P. T.; MALMBERG, R. L. Quick links to online content DO POLYAMINES HAVE ROLES IN. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 235–269, 1989.
- FAO. State Of The World's Forests Food And Agriculture Organization Of The United Nations. Rome: [s.n.]. p. 144
- FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Planta. p. 189-198, 1989.
- FARRANT, J.; PAMMENTER, N.; BERJAK, P. The increasing desiccation sensitivity of recalcitrant *Avicennia marina* seeds with storage time. **Physiologia Plantarum**, v. 67, p. 291–298, 1986.
- FENG, D.-R. et al. Over-expression of a cold-induced plasma membrane protein gene (MpRCI) from plantain enhances low temperature-resistance in transgenic tobacco. **Environmental and Experimental Botany**, v. 65, n. 2-3, p. 395–402, 2009.
- FILIPPOU, P.; ANTONIOU, C.; FOTOPOULOS, V. The nitric oxide donor sodium nitroprusside regulates polyamine and proline metabolism in leaves of *Medicago truncatula* plants. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 56, p. 172–83, 2013.
- FINCH-SAVAGE, W. The role of developmental studies in research on recalcitrant and intermediate seeds (A. Oudraogo, K. Poulsen, Stubsgaard, Eds.)Improved Methods of Handling and Storage of Intermediate/Recalcitrant. Anais .Rome: Humlebaek, 1996
- FORD, C. S.; JONES, N. B.; VAN STADEN, J. Cryopreservation and plant regeneration from somatic embryos of Pinus patula. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 6, p. 610–615, 2000.
- FORNI, C. et al. Polyamine concentration, transglutaminase activity and changes in protein synthesis during cryopreservation of shoot tips of apple variety Annurca. **Cryo Letters**, v. 31, n. 5, p. 413–425, 2010.
- FRETZ, A.; LÖRZ, H. Cryopreservation of in vitro Cultures of Barley (*Hordeum vulgare* L. and *H. murinum* L.) and Transgenic Cells of Wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Plant Physiology**, v. 146, n. 4, p. 489–496, 1995.
- FULLER, B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. **Cryo Letters**, v. 25, n. 6, p. 375–388, 2004.
- GADEA, J. et al. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Theriogenology**, v. 62, n. 3-4, p. 690–701, 2004.

- GALE, S.; BENSON, E.; HARDING, K. A life cycle model to enable research of cryostorage recalcitrance in temperate woody species: the case of sitka spruce (*Picea sitchensis*). **Cryo Letters**, v. 34, n. 1, p. 30–39, 2013.
- GALSTON, A W.; SAWHNEY, R. K. Polyamines in plant physiology. **Plant Physiology**, v. 94, n. 2, p. 406–410,1990.
- GARCIA, R. Flora fanerogâmica do estado de São Paulo. São Paulo: Hucitec, 2002. p. 1–4.
- GERRITS, P. O. The application of glycol methacrylate in histotechnology; some fundamental principles. [s.l.] State University Groningen, 1991.
- GONZALEZ-ARNAO, M. et al. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures cultures of tropical crops. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 92, p. 1–13, 2008.
- 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**, v. 92, n. 1, p. 1–13, 2007.
- GRIFFITH, M.; HUNER, N. P.; HAYDEN, D. B. Low temperature development of winter rye leaves alters the detergent solubilization of thylakoid membranes. **Plant physiology**, v. 81, n. 2, p. 471–477, 1986.
- GRIFFITH, M.; YAISH, M. W. F. Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. **Trends in plant science**, v. 9, n. 8, p. 399–405, 2004.
- GROSSNICKLE, S.; SUTTON, B. Applications of biotechnology for forest regeneration. **New Forests**, v. 17, p. 213–226, 1999.
- GUERRA, M. et al. Exploração, manejo e conservação da araucária (Araucaria angustifolia). In: SIMÕES, L.; LINO, C. (Ed.). Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais. São Paulo: SENAC, 2002.
- GUERRA, M.; KEMPER, E. Tecnologias Futuras: Aplicação da poliembriogênese somática para a propagação massal de plantas elite de Araucaria angustifolia (Bert) O Ktze. In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS. São Paulo, 1992. **Anais...** São Paulo, 1992.
- GUERRA, M. P. et al. Somatic Embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (BERT) O. KTZE. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. (Ed.). **Somatic embryogenesis in woody plants**. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 457.
- GUPTA, P. K.; DURZAN, D. J. Biotechnology of Somatic Polyembryogenesis and Plantlet Regeneration in Loblolly Pine. **Bio/Technology**, v. 5, n. 2, p. 147–151, 1987.

GUSTA, L. V.; TRISCHUK, R.; WEISER, C. J. Plant Cold Acclimation: The Role of Abscisic Acid. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 24, n. 4, p. 308–318, 2005.

HÄGGMAN, H.; RUSANEN, M.; JOKIPII, S. Cryopreservation of In Vitro Tissues of Deciduous Forest Trees. New York: Springer New York, 2008. p. 365–386

HÄGGMAN, H.; RUSANEN, M.; JOKIPII, S. Cryopreservation of in vitro tissues of deciduous forest trees. In: REED, B. M. (Ed.). **Cryopreservation: A Practical Guide**. [s.l.] Springer, 2008.

HANCOCK, J.; NEIL, S.; WILSON, I. Nitric oxide and ABA in the control of plant function. **Plant Science**, v. 181, n. 5, p. 555–559, 2010.

HANDRO, W. Araucaria (*Araucaria* spp.). In: BAJAJ, Y. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry.** Heidelberg: Springer-Verlag, 1986. p. 310–315.

HARGREAVES, C. et al. Cryopreservation and Plant Regeneration of Select Genotypes and Transformed Embryogenic Tissue of *Pinus radiata*. Conifer Biotechnology Work Group: 7th Int Conf. Surfers Paradise. **Anais**. Queensland: 1995

HARGREAVES, C. et al. Cryopreservation of *Pinus radiata* zygotic embryo cotyledons: effect of storage duration on adventitious shoot formation and plant growth after 2 years in the field. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 34, n. 3, p. 600–608, 2004.

HASHIMOTO, M.; KOMATSU, S. Proteomic analysis of rice seedlings during cold stress. **Proteomics**, v. 7, p. 1293–1302, 2007.

HAZUBSKA-PRZYBYŁ, T. et al. Survival and genetic stability of *Picea abies* embryogenic cultures after cryopreservation using a pregrowth-dehydration method. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 113, n. 2, p. 303–313, 2013.

HEINO, P. et al. Abscisic acid deficiency prevents development of freez- ing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 79, p. 801–806, 1990.

HELLIOT, B. et al. Ultrastructural changes associated with cryopreservation of banana (*Musa* spp.) highly proliferating meristems. **Plant Cell Reports**, v. 21, n. 7, p. 690–698, 2003.

HENRÍQUEZ, C. et al. Characterization of piñon seed (*Araucaria araucana* (Mol) K. Koch) and the isolated starch from the seed. **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 592–601, 2008.

HIILOVAARA-TEIJO, M. et al. Snow-mold-induced apoplastic proteins in winter rye leaves lack antifreeze activity. **Plant Physiology**, v. 121, p. 665–674, 1999.

HOEKSTRA, F. A; GOLOVINA, E. A; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 9, p. 431–438, 2001.

- HÖHNE, G. W. H.; HEMMINGER, W. F. **Differential Scanning Calorimetry.** Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. [s.l: s.n.]. 2003, p. 298
- HUGHES, M. A.; DUNN, M. A. The molecular biology of plant acclimation to low temperature. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, n. 3, p. 291–305, 1996.
- IBPGR. **Geneflow: a Publication About the Earth's Plant Genetic Resources**. Rome: IBPGR, 1993. p. 19
- INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M. Oxidative stress in plants. **Current Opinion Biotechnology**, v. 6, p. 153–158, 1995.
- IRIMIA, D.; KARLSSON, J. O. M. Kinetics and mechanism of intercellular ice propagation in a micropatterned tissue construct. **Biophysical Journal**, v. 82, n. 4, p. 1858–1868, 2002.
- IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species, 2009.
- JARDA, L. et al. Ex situ conservation of *Dianthus giganteus* d ' Urv . subsp . banaticus (Heuff .) Tutin by in vitro culture and assessment of somaclonal variability by molecular markers. **Turkish Journal of Biology**, v. 37, p. 1–10, 2013.
- JARZĄBEK, M.; PUKACKI, P. M.; NUC, K. Cold-regulated proteins with potent antifreeze and cryoprotective activities in spruces (*Picea* spp.). **Cryobiology**, v. 58, n. 3, p. 268–274, 2009.
- JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique. New York: McGraw-Hill, 1940. p. 523
- JOHNSON, T.; CRUSE-SANDERS, J.; PULLMAN, G. Micropropagation and seed cryopreservation of the critically endangered species Tennessee yellow-eye grass, *Xyris tennesseensis* Kral. In: **Vitro Cell Dev Biol-Plant**, v. 48, p. 369–376, 2012.
- JOROV, A.; ZHOROV, B. S.; YANG, D. S. C. Theoretical study of interaction of winter flounder antifreeze protein with ice. **Protein Science**, v. 13, p. 1524–1537, 2004.
- JOY, R. et al. Development of white spruce somatic embryos: I. Storage product deposition. In Vitro Cellular & Developmental Biology, v. 27, n. 1, p. 32–41, 1991.
- KACZMARCZYK, A. Physiological, biochemical, histological and ultrastructural aspects of cryopreservation in meristematic tissue of potato shoot tips. [s.l.] Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2008.
- KAGEYAMA, P. Y.; FERREIRA, M. Propagação vegetativa por enxertia Araucaria angustifolia (Bert.) O. Ktze. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, Piracicaba**, v. 11, p. 1195–1202, 1975.
- KALITA, V. et al. Vitrification-based cryopreservation of shoot-tips of Pinus kesiya Royle Ex. Gord. **CryoLetters**, v. 33, n. 1, p. 58–68, 2012.

- KARTHA, K. Cryopreservation of plant cells and organs. Boca Raton: CRC Press, 1985.
- KARTHA, K. K. et al. Induction of Somatic Embryos and Plantlets from Cryopreserved Cell Cultures of White Spruce (*Picea glauca*). **Journal of Plant Physiology**, v. 132, n. 5, p. 529–539, 1988.
- KAVIANI, B. Review article Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 6, p. 778–800, 2011.
- KIM, T. E. et al. ABA and polyamines act independently in primary leaves of coldstressed tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Physiologia Plantarum**, v. 115, n. 3, p. 370–376, 2002.
- KITO K, KAGAMI H, KOBAYASHI C, UEDA M, T. H. Effects of cryopreservation on histology and viability of cultured corneal epithelial cell sheets in rabbit. **Cornea**, v. 24, n. 6, p. 735–41, 2005.
- KNIGHT, C. A.; HALLETT, J.; DEVRIES, A. L. Solute effects on ice recrystallization: An assessment technique. **Cryobiology**, v. 25, p. 55–60, 1988.
- KONG, L.; PATRICK VON, A. A novel method of cryopreservation without a cryoprotectant for immature somatic embryos of conifer. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, n. 1, p. 115–125, 2011.
- KONIECZNY, R. et al. Oxidative events during *in vitro* regeneration of sunflower. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, p. 71–79, 2008.
- KRANNER, I.; BIRTIC, S. A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. **Integrative and Comparative Biology 4**, v. 5, n. 5, p. 734–740, 2005.
- KUMAR, S.; KAUR, G.; NAYYAR, H. Exogenous application of abscisic acid improves cold tolerance in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Journal of Agronomy and Crop Science**, p. 449–456, 2008.
- KURIYAMA, H.; FUKUDA, H. Developmental programmed cell death in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 568–573, 2002.
- LAAMANEN, J.; UOSUKAINEN, M.; HAEGGMAN, H. Cryopreservation of crop species in Europe. **Proceedings of the Agrifood Research Finland**, 2008.
- LAINE, E.; BADE, P.; DAVID, A. Recovery of plants from cryopreserved embryogenic cell suspensions of Pinus caribaea. **Plant Cell Reports**, v. 11-11, n. 5-6, p. 295–298,1992.
- LALK, I.; DORFFING, K. Hardening, abscisic acid, proline and freezing resistance in two winter wheat varieties. **Physiol Plant**, v. 63, p. 287–292, 1985.

- LAM, E. Controlled cell death, plant survival and development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 305–315, 2004.
- LANG, V.; HEINO, P.; PALVA, E. Low temperature acclimation and treatment with exogenous abscisic acid induce common polypeptides in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 79, p. 801–806, 1989.
- LANGIS, R. et al. Cryopreservation of Brassica napus suspensions by vitrification. **Cryo Letters**, v. 10, p. 421–428, 1989.
- LAXALT, A. et al. Nitric oxide is critical for inducing phosphatidic acid accumulation in xylanase-elicited tomato cells. **J Biol Chem**, v. 282, n. 29, p. 21160–21168, 2007.
- LEE, B.; HENDERSON, D. A.; ZHU, J. The *Arabidopsis* Cold-Responsive Transcriptome and Its Regulation by ICE1. v. 17, p. 3155–3175, 2005.
- LEE, S.; CHEN, T. Molecular cloning of abscisic acid responsive mRNAs expressed during the induction of freezing tolerance in bromegrass (*Bromus inermis* Leyss) suspension culture. **Plant Physiology**, v. 101, p. 1089–1096, 1993.
- LEE, T.; LUR, H.; CHU, C. Role of abscisic add in chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. I. Endogenous abscisic acid levels. **Plant Cell Environ**, v. 16, p. 481–490, 1993.
- LEE, Y. P. et al. Comparison of freezing tolerance, compatible solutes and polyamines in geographically diverse collections of *Thellungiella* sp. and *Arabidopsis* thaliana accessions. **BMC Plant Biology**, v. 12, n. 1, p. 131, 2012.
- LEHNER, I.; NIEHOF, M.; BORLAK, J. An optimized method for the isolation and identification of membrane proteins. **Electrophoresis**, v. 24, p. 1795–1808, 2003.
- LEITE, P.; KLEIN, R. Vegetação. In: INSTITUTO BRASILEIRA DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Geografia do Brasil Região Sul**. Rio de Janeiro, 1990. p. 113–150.
- LEUNG, J.; GIRAUDAT, J. Abscisic Acid Signal Transduction. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 199–222, 1998.
- LI, X.; HEW, C. Expression and characterization of an active and thermally more stable recombinant antifreeze polypeptide from ocean pout, Macrozoarces americanus, in *Escherichia coli*: improved expression by modifying the secondary structure of the mRNA. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 4, p. 996–1002, 1991.
- LILLIE, R. D. **Histopathologic technic and practical histochemistry**. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, 1965. p. 715

- LIU, Y.; WANG, X.; LIU, L. Analysis of genetic variation in surviving apple shoots following cryopreservation by vitrification. **Plant Science**, v. 166, n. 3, p. 677–685, 2004.
- LLOYD, G.; B, M. Commercially feasible micro-propagation of *Mountain laurel*, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Int Plant Prop Soc Proc**, v. 30, p. 421–427, 1981.
- MANTOVANI, A.; MORELLATO, L. P. C.; DOS REIS, M. S. Internal genetic structure and outcrossing rate in a natural population of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **The Journal of heredity**, v. 97, n. 5, p. 466–472, 2006.
- MANTYLA, E.; LANG, V.; PALVA, E. Role of abscisic acid in drought-induced freezing tolerance, cold acclimation, and accumulation of LT178 and RAB18 proteins in *Arabidopsis thaliana*. **Plant physiology**, v. 107, p. 141–148, 1995.
- MATTHEWS, S.; BRADNOCK, W. T. The detection of seed samples of wrinkle-seeded peas (*Pisum sativum* L) of low planting value. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, v. 32, p. 553–563, 1967.
- MAZUR, P. The Role of Cell Membranes in the Freezing of Yeast and Other Single Cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 125, p. 658–676, 1965.
- MAZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. **Science (New York)**, v. 168, n. 3934, p. 939–949, 1970.
- MAZUR, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology**, v. 14, p. 251–272, 1977.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal Physiology**, v. 247, n. 19, p. 1–4, 1984.
- MAZUR, P.; KOSHIMOTO, C. Is intracellular ice formation the cause of death of mouse sperm frozen at high cooling rates? **Biology of reproduction**, v. 66, n. 5, p. 1485–1490, 2002.
- MCGANN, L. Optimal Temperature Ranges for Control of Cooling rate. **Cryobiology**, v. 16, p. 211–216, 1979.
- MEDEIROS, A. et al. The moisture relations of seed longevity in *Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engl. **Seed Science and Technology**, v. 26, p. 289–298, 1998.
- MEDEIROS, J.; SAVI, M.; BRITO, B. Seleção de áreas para criação de Unidades de Conservação na Floresta Ombrófila Mista. **Biotemas**, v. 18, n. 2, p. 33–50, 2005.
- MERYMAN, H. T.; WILLIAMS, R. J.; DOUGLAS, M. S. J. Freezing injury from "solution effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection. **Cryobiology**, v. 14, n. 3, p. 287–302, 1977.

MERYMAN, T. Isotonicity in the presence of penetrating cryoprotectant. **Cryobiology**, v. 19, p. 565–569, 1982.

MICHELI, F. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiologye. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 9, p. 414–419, 2001.

MITTLER, R. et al. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, v. 9, 10, p. 490–498, 2004.

MOHAPTRA, S.; POOLE, R.; DHINDSA, R. Abscisic acid- regulated gene expression in relation to freezing tolerance of cold-acclimated-specific genes of alfalfa. **Plant Physiology**, v. 89, p. 375–380, 1988.

MOTA, S.; CRAMER, E. O valor nutritivo do pinhão. **Engenharia e Química**, v. 5, n. 5, p. 1–9, 1953.

NADARAJAN, J. et al. Applications of differential scanning calorimetry in developing cryopreservation strategies for Parkia speciosa, a tropical tree producing recalcitrant seeds. **CryoLetters**, v. 29, p. 95–110, 2008.

NAG, K.; STREET, H. Carrot Embryogenesis from Frozen Cultured Cells. **Nature**, v. 245, p. 270–272, 1973.

NAKAMURA, T. et al. Characterization of cold-responsive extracellular chitinase in bromegrass cell cultures and its relationship to antifreeze activity. **Plant Physiology**, v. 147, n. 1, p. 391–401, 2008.

NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, p. 165–185, 2005.

NASH, T. The Chemical Constitution of Compounds Which Protect Erythrocytes against Freezing Damage. **The Journal of General Physiology**, v. 46, n. 1, p. 167–175,1962.

NEUHOFF, V. et al. Essential problems in quantification of proteins following colloidal staining with Coomassie Brilliant Blue dyes in polyacrylamide gels, and their solution. **Electrophoresis**, v. 11, p. 101–117, 1990.

NIEVES, N. et al. Effect of abscisic acid and jasmonic acid on partial desiccation of encapsulated somatic embryos of sugarcane. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 65, p. 15–21, 2001.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **O Protoplasma**, v. 59, p. 368–373, 1964.

OKTAY, M. et al. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: An emerging technology. **Fertility and Sterility**, v. 69, n. 1, p. 1–7, 1998.

OSBORNE, D.; BOUBRIAK, I.; LEPRINCE, O. Rehydration of dried systems: membranes and nuclear genome. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. (Eds.). **Desiccation and Survival in Plants: Drying without Dying**. CAB Intern ed. Wallingford: [s.n.]. 2002, p. 343–364.

OUFIR, M. et al. Gene expression in potato during cold exposure: Changes in carbohydrate and polyamine metabolisms. **Plant Science**, v. 175, n. 6, p. 839–852, 2008.

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

PAMMENTER, N.; BERJAK, P. Evolutionary and ecological aspects of recalcitrant seed biology. **Seed Science Research**, p. 301–306, 2000.

PAMMENTER, N.; VERTUCCI, C.; BERJAK, P. Responses to Dehydration in Relation to Non-Freezable Water in Desiccation-Sensitive and Tolerant Seeds (D. Côme, F. Corbineau, Eds.). Fourth international workshop on sed. Basic and applied aspects of seed biolgy. Anais. Paris: 1993

PAMMENTER, N. W.; VERTUCCI, C. W.; BERJAK, P. Homeohydrous (Recalcitrant) Seeds: Dehydration, the State of Water and Viability Characteristics in *Landolphia kirkii*. **Plant physiology**, v. 96, n. 4, p. 1093–1098, 1991.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of Cryopreservation Technologies in Plants (crops and forest trees). The role of biotechnology. Anais. Vila Gualino: 2005.

PEI, Z.-M. et al. Identification of a Plant Nitric Oxide Synthase Gene Involved in Hormonal Signaling. **Nature**, v. 406, p. 731–734, 2000.

PELAH, D. et al. Differential accumulation of water stress-related proteins, sucrose synthase and soluble sugars in Populus species that differ in their water stress response. **Physiologia Plantarum**, v. 99, n. 1, p. 153–159, 1997.

PENCE, V. C. Cryopreservation of recalcitrant seeds. **Biotechnology in Agriculture** and **Foresty**, v. 32, p. 29–50, 1995.

PIERUZZI, F. P. et al. Polyamines, IAA and ABA during germination in two recalcitrant seeds: *Araucaria angustifolia* (Gymnosperm) and *Ocotea odorifera* (Angiosperm). **Annals of botany**, v. 108, n. 2, p. 337–345, 2011.

PIHAKASKI-MAUNSBACH, K. et al. Antifreeze proteins are secreted by winter rye cells in suspension culture. **Physiologia Plantarum**, v. 118, n. 3, p. 390–398, 2003.

POLGE, C.; SMITH, A.; PARKES, A. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, p. 666, 1949.

PROCHNOW, M. O Parque Nacional das Araucárias e a Estação Ecológica da Mata Preta: Unidades de Conservação da Mata Atlântica. Rio do Sul: APREMAVI, 2009. p. 72

QUATRANO, R. S. Freeze-Preservation of Cultured Flax Cells Utilizing Dimethyl Sulfoxide. **Plant Physiology**, v. 43, p. 2057–2061, 1968.

RAGHAVENDRA, A. S. et al. ABA perception and signalling. **Trends in Plant science**, v. 15, n. 7, p. 395–401, 2010.

RAMON, M. et al. Polyamines and fatty acids in sucrose precultured banana meristems and correlation with survival rate after cryopreservation. **Cryo Letters**, v. 23, n. 6, p. 345–352, 2002.

REED, B. M. et al. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, v. 47, n. 1, p. 1–4, 2011.

REINHOUD, P.; IREN, F. VAN; KIJNE, J. Cryopreservation of undifferentiated plant cells. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Eds.). **Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm**. [s.l.] Japan Int. Res. Center for Agricultural Sciences, 2000. p. 91–97.

REITZ, R.; KLEIN, R. Flora Ilustrada Catarinense: Araucariáceas. Itajaí: Sudesul, 1966. p. 62

REVILLA, M. A.; MARTÍNEZ, D. Cryopreservation of *Humulus lupulus* L. (Hop). In: TOWILL, L.; BAJAJ, Y. (Eds.). **Biotechnology in Agricultue and Forestry, Cryopreservation of Plant Germplasm II**. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 2002. p. 136–150.

RIBEIRO, S. et al. The Formation And The Effects Of The Reactive Oxygen Species. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133–149, 2005.

ROBERTS, E. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v. 1, p. 499–514, 1973.

ROCK, C.; SAKATA, Y.; QUATRANO, R. Stress Signaling I: The Role of Abscisic Acid (ABA). In: PAREEK, A. (Ed.). **Abiotic Stress Adaptation in Plants**. [s.l: s.n.]. p. 33–73.

ROGGE-RENNER, G. D. et al. Structural and component characterization of meristem cells in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze zygotic embryo. **Protoplasma**, 2012.

ROWNTREE, J. K. et al. Formation of specialized propagules resistant to desiccation and cryopreservation in the threatened moss *Ditrichum plumbicola* (Ditrichales, Bryopsida). **Annals of botany**, v. 100, n. 3, p. 483–96, 2007.

- ROWNTREE, J. K. et al. Formation of specialized propagules resistant to desiccation and cryopreservation in the threatened moss Ditrichum plumbicola (Ditrichales, Bryopsida). **Annals of Botany**, v. 100, n. 3, p. 483–496, 2007.
- SAKAI. Life in the Frozen State. Boca Raton: CRC Press, 2004. p. 329–345
- SAKAI, A. Development of cryopreservation techniques. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Eds.). **Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current research progress and application**. Tsukuba: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p. 1–7.
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (Citrus sinensis Osb. var. brasiliensis Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 30–33, 1990.
- SAKAI, A.; SUGAWARA, Y. Survival of plant germoplasm in liquid nitrogen. In: SAKAI, A. (Ed.). **Plant Cold Hardiness and Freezing Stress: Mechanisms and Crop Implications**. New York: Academic Press, 1978. p. 416.
- SALAJ, J. et al. Regrowth of embryogenic tissues of Pinus nigra following cryopreservation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, p. 55–61, 2011.
- SANTA-CATARINA, C. et al. IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of Ocotea catharinensis. **Plant Growth Regulation**, v. 49, n. 2-3, p. 237–247, 2006.
- SANTA-CATARINA, C SILVEIRA, V. et al. The use of somatic embryogenesis for mass clonal propagation and biochemical and physiological studies in woody plants. **Current Topics in Plant Biology**, v. 13, p. 103–119, 2013.
- SANTNER, A.; CALDERON-VILLALOBOS, L. I. A; ESTELLE, M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 5, p. 301–307, 2009.
- SANTOS, A. et al. Somatic embryogenesis in Parana Pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze). **Brazilian Archives Biology Technology**, v. 45, p. 97–105, 2002.
- SANTOS, A. et al. Biochemical and morphological changes during the growth kinetics of Araucaria angustifolia suspension cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 497–504, 2010.
- SANTOS, A. L. W. DOS et al. Somatic embryogenesis in parana pine (*Araucaria angustifolia*) (Bert.) O. Kuntze). **Brazilian archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 1, p. 97–106, 2002.
- SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 70–84, 2000.

SANTOS, I. R. I. Ciopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 20, p. 60–65, 2001.

SCHERER, G. Nitric oxide in cytokinin and polyamine signalling: similarities and potential crosstalk. In: LAMATTINA, L.; POLACCO, J. (Ed.). **Nitric oxide in plant growth, development and stress physiology.** Heidelberg: Springer, 2007. p. 283.

SCHLÖGL, P. et al. Gene expression during early somatic embryogenesis in Brazilian pine (*Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 108, p. 173–180, 2012.

SCHRIJNEMAKERS, E. W. M.; VAN IREN, F. A two-step or equilibrium freezing procedure for the cryopreservation of plant cell suspensions. In: MR, M.; JG, D. (Eds.). **Cryopreservation and Freeze Drying Protocols**. Totowa: Humana Press, 1995. p. 103–112.

SERSHEN et al. Cryo-tolerance of zygotic embryos from recalcitrant seeds in relation to oxidative stress--a case study on two amaryllid species. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 10, p. 999–1011, 2012.

SHEN, W.; NADA, K.; TACHIBANA, S. Involvement of polyamines in the chilling tolerance of cucumber cultivars. **Plant physiology**, v. 124, n. 1, p. 431–439, 2000.

SHIMOYA, C. contribuição ao estudo do ciclo biológico de *Araucaria angustifolia* (Bertolini) O. Ktze. **Experimentiae**, v. 2, p. 520–540, 1962.

SILVEIRA, V. et al. Biotechnology tolls in Araucaria angustifolia conservation and improvement: inductive factors affecting somatic embryogenesis. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 463–470, 2002.

SILVEIRA, V. et al. Biochemical changes during seed development in *Pinus taeda* L. **Plant Growth Regulation**, v. 44, p. 147–156, 2004.

SILVEIRA, V. et al. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. **Plant Cell Tissue**, v. 76, p. 53–60, 2004.

SILVEIRA, V. et al. Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of Araucaria angustifolia (Bert.) O. Ktze. **Plant Science**, v. 171, n. 1, p. 91–98, 2006.

SOUSA, V.; HATTEMER, H. Pollen dispersal and gene flow by pollen in *Araucaria* angustifolia. **Australian Journal Botany**, v. 51, p. 309–317, 2003.

SPURR, A. R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 26, p. 31–43, 1969.

- STASOLLA, C.; YEUNG, E. C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, n. 1, p. 15–35, 2003.
- STEFENON, V. M. et al. Evidences of delayed size recovery in Araucaria angustifolia populations after post-glacial colonization of highlands in Southeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, n. 3, p. 433–443, 2008.
- STEINER, N. Parâmetros fisiológicos e bioquímicos durante a embriogênese zigótica e somática de Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina. 2005.
- STEINER, N. et al. Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in Araucaria angustifolia embryogenic cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, n. 1, p. 55–62, 2007.
- STEINER, N. et al. Araucaria angustifolia Biotechnology. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 20–28, 2008.
- STEPONKUS, P. L.; WEBB, M. S. Freeze- induced dehydration and membrane destabilization in plants. In: SOMERO, G. N.; OSMOND, C. B.; BOLIS, C. L. (Eds.). Water and life: Comparative Analysis of Water Relationships at the Organismic, Cellular and Molecular. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 1992. p. 338–362.
- STUSHNOFF, C.; SEUFFERHELD, M. Cryopreservation of Apple (Malus species) Genetic Resources. In: BAJAJ, Y. (Ed.). **Cryopreservation of Plant Germplasm I**. Berlin: Springer, 1995. p. 87–101.
- SUZUKI, N.; MITTLER, R. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. **Physiologia Plantarum**, p. 45–51, 2005.
- SZTEIN, J. M. et al. Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. **Cryobiology**, v. 42, n. 1, p. 28–39, 2001.
- TERESO, S. et al. Zygotic and somatic embryo morphogenesis in *Pinus pinaster:* comparative histological and histochemical study. **Tree physiology**, v. 27, n. 5, p. 661–669, 2007.
- THOMSON, L. K. et al. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. **Human Reproduction**, v. 24, n. 9, p. 2061–2070, 2009.
- TUN, N. N. et al. Zeatin-induced nitric oxide (NO) biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* mutants of NO biosynthesis and of two-component signaling genes. **The New phytologist**, v. 178, n. 3, p. 515–531, 2008.

UCHENDU, E. E. et al. Vitamins C and E improve regrowth and reduce lipid peroxidation of blackberry shoot tips following cryopreservation. **Plant Cell Reports**, v. 29, n. 1, p. 25–35, 2010.

URAGAMI, A. et al. Survival of cells and somatic embryos of Asparagus o• cinalis cryopreserved by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 8, p. 418–421, 1989.

URANO, K. et al. Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in Arabidopsis by metabolomics. **The Plant journal: For Cell and Molecular Biology**, v. 57, n. 6, p. 1065–1078, 2009.

VAAS, L.; MARHEINE, M.; SEUFERT, S. Impact of pr-10a overexpression on the cryopreservation success of *Solanum tuberosum* suspension cultures. **Plant Cell Reports**, p. 1061–1071, 2012.

VAN BREUSEGEM, F.; DAT, J. Reactive oxygen species in plant cell death. **Plant Physiology**, v. 141, p. 384–390, 2006.

VANHOUTTE, L. et al. Effects of chilling on structural aspects of early preantral mouse follicles. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 4, p. 1041–1048, 2004.

VERSLUES, P. E. et al. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant journal:** For Cell and Molecular Biology, v. 45, n. 4, p. 523–539, 2006.

VERTUCCI, C. Relationship between thermal transitions and freezing injury in pea and soybean seeds. **Plant Physiology**, v. 90, p. 1121–1128, 1989.

VERTUCCI, C. Calorimetric studies on the state of water in seed tissues. **Biophysic Journal**, v. 58, p. 1463–1471, 1990.

VIEIRA, L. et al. Glutathione improves early somatic embryogenesis in *Araucaria* angustifolia (Bert) O. Kuntze by alteration in nitric oxide emission. **Plant Science**, v. 195, p. 80–87, 2012.

VOLK, G. M. Application of functional genomics and proteomics to plant cryopreservation. **Current Genomics**, v. 11, n. 1, p. 24–29, 2010.

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

VONDRÁKOVÁ, Z.; CVIKROVÁ, M. Cryotolerance in Norway spruce and its association with growth rates, anatomical features and polyamines of embryogenic cultures. **Tree**, v. 30, n. 10, p. 1335–1348, 2010.

WAGHORN, J. J. et al. The role of two isoenzymes of -amylase of *Araucaria* araucana (Araucariaceae) on the digestion of starch granules during germination. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 384, p. 901–911, 2003.

- WALTERS, C. et al. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerant and sensitive seeds. p. 135–148, 2001.
- WALTERS, C. et al. Desiccation stress and damage. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. (Eds.). **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford: [s.n.]. p. 263–291.
- WALTERS, C. et al. Cryopreservation of recalcitrant (i.e. desiccation-sensitive) seeds. In: REED, B. (Ed.). **Plant Cryopreservation: a pratical guide**. New York: Springer Science + Business Media LLC, 2008. p. 465–484.
- WANG, B.; CHAREST, P.; DOWNIE, B. **Ex situ storage of seeds, pollen and in vitro cultures of perennial woody plant species**. Rome: Food and Agriculture os the United Nations, 1993. p. 83
- WANG, S.; TSUCHIYA, T.; WILSON, H. Chromossome studies in several species of *Chenopodium* from North and South America. **Journal of Genetic Breed**, v. 47, p. 163–170, 1993.
- WANG, Z.; DENG, X. Cryopreservation of shoot-tips of citrus using vitrification: effect of reduced form of glutathione. **Cryo Letters**, v. 25, n. 1, p. 43–50, 2004.
- WELLING, A.; PALVA, E. T. Molecular control of cold acclimation in trees. **Physiologia Plantarum**, v. 127, n. 2, p. 167–181, 2006.
- WEN, X. et al. Over-expression of the apple spermidine synthase gene in pear confers multiple abiotic stress tolerance by altering polyamine titers. **Transgenic Research**, v. 17, n. 2, p. 251–263, 2007.
- WENDLING, I. Enxertia e Florescimento Precoce em *Araucaria angustifolia*. Colombo: [s.n.], 2011.
- WOSIACKI, G.; CEREDA, M. P. Characterization of Pinhão Starch. Part I. Extraction and Properties of the Starch Granules. **Starch**, v. 37, n. 7, p. 224–227, 1985.
- XIN, Z.; LI, P. Abscisic acid induced chilling tolerance in maize suspension cultured cells. **Plant Physiology**, v. 99, p. 707–711, 1992.
- YAN, J. et al. Reactive oxygen species and nitric oxide are involved in ABA inhibition of stomatal opening. **Plant, Cell & Environment**, v. 30, n. 10, p. 1320–1325, 2007.
- YASHINA, S. et al. Regeneration of whole fertile plants from 30,000-y-old fruit tissue buried in Siberian permafrost. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 10, p. 4008–4013, 2012.
- YE, N.; JIA, L.; ZHANG, J. ABA signal in rice under stress conditions. **Rice**, v. 5, n. 1, p. 1, 2012.

YEATMAN, C. W. Conservation of genetic resources within managed natural and man-made forests. **Forester**, v. 50, p. 1–8, 1987.

YIN, H.; SUN, C. Localization of phosphorylase and of starch formation in seeds. **Plant Physiology**, p. 103–110, 1949.

YU, X.-M.; GRIFFITH, M. Winter rye antifreeze activity increases in response to cold and drought, but not abscisic acid. **Physiologia Plantarum**, v. 112, n. 1, p. 78–86, 2001.

YUAN-ZHEN, L. et al. Plant antifreeze proteins and their expression regulatory mechanism. **Forestry Studies in China**, v. 7, p. 46–52, 2005.

ZAGO, E. et al. Nitric Oxide And Hydrogen Peroxide-Responsive Gene Regulation During Cell Death Induction In Tobacco. **Plant Physiology**, v. 141, p. 404–411, 2006.

ZELLER, G. et al. Stress-induced changes in the Arabidopsis thaliana transcriptome analyzed using whole-genome tiling arrays. **The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology**, v. 58, n. 6, p. 1068–1082, 2009.

ZHANG, X. et al. K + channels inhibited by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in *Vicia* guard cells. **Cell Research**, v. 11, n. 3, p. 195–202, 2001.

APÊNDICE - Artigo submetido para publicação: establishing a protocol for cryopreservation of cell cultures of A. angustifolia: biophysical effects of cryoprotectants on cell survival

Estudos visando o estabelecimento de protocolos regenerativos em *A.angustifolia*, utilizando a técnica de organogênese direta e indireta (HANDRO, 1986) foram desenvolvidos no BIOCEL. Contudo, assim como o observado nas demais coníferas, a baixa taxa de multiplicação e a alta oxidação dos explantes impossibilitaram o uso desta técnica em larga escala para *A. angustifolia*.

As características recalcitrantes da semente e o grande tamanho dos embriões zigóticos de A. angustifolia, dificultam a obtenção de protocolos de criopreservação neste sistema. A associação da embriogênese somática com a criopreservação e com a tecnologia de sementes sintéticas constituem abordagens promissoras, para o estabelecimento de bancos de germoplasma ex-situ de gimnospermas com sementes recalcitrantes, como no caso da A. angustifolia (REED et al., 2011). Em 1992 com o primeiro relato da indução de culturas embriogênicas em A.angustifolia por (GUERRA; KEMPER, 1992), abriu-se a possibilidade da utilização da embriogênese somática e das demais técnicas resultantes associadas (sementes sintéticas e criopreservação) para o estabelecimento de programas de melhoramento genético e conservação baseado no uso de ferramentas biotecnológicas. Desde então, diversos estudos foram desenvolvidos visando o aperfeiçoamento e desenvolvimento de protocolos para indução, proliferação e maturação de embriões somáticos nesta espécie (ASTARITA; GUERRA, 1998; DOS SANTOS et al., 2008; GUERRA et al., 2000; SANTA-CATARINA, C SILVEIRA et al., 2013; SANTOS et al., 2002, 2010; SCHLÖGL et al., 2012; SILVEIRA et al., 2002, 2006; STEINER et al., 2007, 2008; STEINER, 2005; VIEIRA et al., 2012). A utilização da embriogênese somática para propagação clonal e conservação ex situ, de genótipos de A. angustifolia, ainda apresenta uma série de problemas não elucidados. Dentre eles destacam-se: o baixo número de embriões somáticos regenerados e a sua evolução ao longo do processo de maturação. Esta situação é decorrente, em especial, da falta de um conhecimento mais aprofundado dos eventos fisiológicos, bioquímicos e moleculares do desenvolvimento embrionário in vitro.

O presente capítulo descreve uma metodologia desenvolvida, para a criopreservação de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* e constitui manuscrito intitulado "Establishing a protocol for cryopreservation of cell cultures of *A.*

angustifolia: biophysical effects of cryoprotectants on cell survival" submetido para publicação na revista Cryobiology em setembro de 2013.

Establishing a protocol for cryopreservation of cell cultures of *A. angustifolia*: biophysical effects of cryoprotectants on cell survival

Fernanda Piccolo Pieruzzi, Caroline Arcanjo Bueno, Andre Luis Wendt dos Santos, Eny lochevet Segal Floh.

Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão 05422-970 São Paulo, Brazil

Abstract

Araucaria angustifolia is an endangered Brazilian pine. The long-term storage of this conifer is difficult due to physiological and anatomic features. Cryopreservation of cell culture presents an alternative strategy for germplasm conservation in tree species. In this work, we report the development of an efficient cryoprotection protocol for cell culture of A. angustifolia based on optimizing DMSO concentrations to minimize toxic effects and maximize cryoprotective effects. The original mass of cell exposed to < 10% and > 10% DMSO increased by about 500% and 100%, respectively, over a 5week period when not cooled (control). However, toxic effects were evaluated in the cells pretreated with 0.4 M sorbitol and then exposed to media containing 0.4 M sorbitol and 15 to 20% DMSO but not cooled. Only treatment with 20% DMSO showed significant recovery within 5 weeks post-thawing, with amount of mass comparable to counterparts not exposed to liquid nitrogen. Although it suggests that the recovery will delay yield of cell by a few weeks, this method seems the most promising protocol for cryopreservation of *A. angustifolia* cell culture. Furthermore, the evaluation of freeze-drying and recovery aspects of A. angustifolia cell cultures allowed study of the biophysics base of classical cryopreservation procedures. Shrinkage and membrane damage could be directly observed and related to maintenance of cell viability, when cryoprotectants are not applied in an adequate concentration.

Introduction

Cryopreservation is a strategy for long-term conservation based on reduction and subsequent reduction of metabolic functions in biological material by the imposition of ultra-low temperatures in liquid nitrogen (-196 °C) or in vapor phase (-150 °C) (KARTHA, 1985; PANIS; LAMBARDI, 2005). However, according Engelmann (2004), the methodology requires a number of adjustments according to the material used, since few biological systems can be frozen in their natural state without loss of viability. The plant material can thus be stored without irreversible damage for a theoretically unlimited period of time.

Since seeds are the main unit of natural plant propagation, seed storage is the most common method of *ex situ* conservation (SANTOS, 2001). In the event that seed conservation is difficult, other plant tissues such as embryos or embryonic axes, tissues or organs of plants or even cells throughout *in vitro* techniques can be used. This methodology is suitable for species with recalcitrant seed vegetative propagation (ENGELMANN, 1991; KARTHA, 1985; STEFENON et al., 2008) or for tree species requiring many years to go from juvenile to adult reproductive stages (SANTOS, 2000).

Tissue culture associated with cryopreservation provides a significant advantage over conventional strategies since under ultra-low temperatures, cultures do not require periodic transfer, thus allowing maintenance of cultures in juvenile stages, eliminating aging, reducing probability of contamination, somaclonal variation and decreasing maintenance costs (FRETZ; LÖRZ, 1995; SCHRIJNEMAKERS; VAN IREN, 1995). Cryopreservation has been used successfully for many species including conifers *Picea glauca* (KARTHA et al., 1988), *Pinus caribea* (LAINE; BADE; DAVID, 1992), *Pinus patula* (FORD; JONES; VAN STADEN, 2000), *Pinus radiata* (HARGREAVES et al., 2004). In these materials, regeneration of the plants was obtained after thawing of embryogenic tissues.

The aim of this work was the development of a cryoprotectant protocol for cell culture of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, that presents natural occurrence in the Atlantic Forest biome (LEITE; KLEIN, 1990). This conifer is a pioneer species and produces giant seeds (6-7 grams of mass) consumed by wildlife (REITZ; KLEIN, 1966) and humans (MOTA; CRAMER, 1953). Although of ecological and economic

importance, the amount of individuals for this conifer was extensively reduced in nature due to logging and degradation of the natural environment (PROCHNOW, 2009). Currently, *A. angustifolia* is considered critically endangered (IUCN, 2013) and a high-priority species for conservation programs and forest regeneration (MEDEIROS; SAVI; BRITO, 2005). Despite the fragility of the species in the wild, there is no long-term conservation established until now. Some anatomic and physiological features represent a challenge for its conservation including late reproductive maturity (CARVALHO, 1994), large embryo size (about 2.5 cm of length) and seed recalcitrance (ROBERTS, 1973).

The present work is the first report of long-term conservation of *A. angustifolia* system for the long-term storage *A. angustifolia* cell culture, adapted from procedures described by Hargreaves (1995) for Monterey pine (*Pinus radiata*). The strategy applied was based in a classical technique involving slow cooling, known also as two-step cooling. The procedure involves a step of low freezing (freeze-drying) with the use of cryoprotectants, followed by plunging in LN and a fast thawing for recovery. The results of this study will enable the early establishment of *ex situ* gene banks, and assist the optimization of protocols for somatic embryogenesis in this species, and preservation of cell lines with embryogenic potential, still under study (ASTARITA; GUERRA, 1998; DOS SANTOS et al., 2008; GUERRA et al., 2000; SANTOS et al., 2002).

Materials and methods

Plant Material

Cell cultures of *A. angustifolia* obtained from immature zygotic embryos were used for the study.

Cell culture induction and maintenance

Immature seeds of *A. angustifolia* were immersed for 5 min. in 70% (v / v) ethanol and 25 min. in solution 50% (v / v) of sodium hypochlorite (2-2.5% (w / v) active chlorine). After rinsing with autoclaved distilled water, seeds were opened inside the laminar flow hood, and immature zygotic embryos isolated. The immature

zygotic embryos used as explants were inoculated into culture medium MSG (BECWAR; WANN; JOHNSON, 1987) previously distributed in Petri dishes (49x13 mm). Four explants per plate cultivation were used. Cultures were maintained in the dark at 25 °C, with 21-day cycle between subcultures.

Cryopreservation procedure

The protocol used was adapted from that proposed by Hargreaves (1995), detailed below and summarized in Fig. 5.1.

Preculture and cooling

Six grams of *A. angustifolia* cell cultures 7 days old were equally distributed into a six-well tissue culture plate (1 gram of cell per well). Then, 3 ml of MSG (BECWAR; WANN; JOHNSON, 1987) basal medium supplemented with liquid 0.4 M sorbitol and preconditioned for 15 min on ice (MSG + sorbitol) was added in each well. The plates with the suspensions were kept in a rotary shaker for 24 hours and then transferred to a flask with ice for 15 mins.

At the same time, solutions were prepared with DMSO (dimethylsulphoxide) (10, 20, 30 and 40% (v / v)) diluted in MSG with 0.4 M sorbitol, 3 ml aliquots of each solution, precooled on ice for 15 min, and added to cell suspensions, reaching a final volume of 6 ml in each well and resulting in four different treatments where the final concentrations of DMSO were 5, 10, 15 and 20%. The plates were kept on ice for another 15 min. Then, 1 ml aliquots of the cell suspensions from each treatment were dispensed into 1.8 ml cryovials and transferred to a freezing container NalgeneTM Cryo - 1°C (Mr. Frosty) and placed in freezer -80°C for 2 h in order to be cooled and frozen slowly at a rate of -1°C min⁻¹. After this period, the samples were transferred to a cryobox and immersed in liquid nitrogen (LN), where they remained for 48 h.

Thawing and recovery

After 48 h in LN, the cryovials containing cell suspensions were transferred to a water bath at 42°C for 4-6 min in order for quick thawing. The vial contents were placed over sterile filter paper and the supernatant removed through vacuum

filtration. The filter paper containing cells was transferred to a MSG semi-solid media and kept at 25°C in the dark. The filter containing cells were transferred to a fresh MSG media after 24 h and after every week for 6 weeks.

Morphological analysis

Morphological analysis was performed using a double staining method developed for loblolly pine (GUPTA; DURZAN, 1987). The protocol consists of using Evans Blue dye to identify cells with loss of viability of the membrane, and acetocarmine acid (2%) for staining cells containing nuclear contents. For this purpose, two drops of Evans Blue dye were added in 200 mg of cell culture and, after 2 min, two drops of carmine acid (2%). Cells were then rinsed with distilled water to remove excess dye. The material was observed in stereomicroscope coupled to a digital camera and photographed.

Data analysis

Four replicates were used per treatment. For each one, four replicates were directly transferred to recovery conditions after treatment but without cooling or thawing (control). A second and third control, untreated and cooled and not cooled, respectively, was also included. Growth of cell culture on fresh semi-solid MSG media was monitored weekly by change of fresh mass.

The recovery was determined as the percentage (%) of mass increase (MI): MI: 100 x (mass of day i –mass of day 0) / mass of day 0 (LAINE; BADE; DAVID, 1992).

The standard error (SE) for each treatment was determined using the Excel 2010 program.

Results and discussion

The first successful experiments on cryopreservation of plant cells were reported for flax (*Linum usitatissimum*) (QUATRANO, 1968) and carrot suspension-cultured cells that could produce viable embryos (NAG; STREET, 1973). Since a

methodology that could be universally applied for all types of plant cells is absent, research efforts have focused on optimizing the protocol success factors. These include starting material, pretreatment, cryopreservation procedure and post-thaw treatment, as reviewed by (REINHOUD; IREN; KIJNE, 2000).

In the present work, the growth of cells that were not cooled in the control could be obtained in all concentrations of DMSO applied. Among them, amount of cells was maximum around 500%, after 5 weeks of recovery, in concentration equal to or less than 10%. At concentrations equal to or higher than 15% DMSO, cell cultures showed a lower mass increase, around 150%, in the same period (Fig. 5.2.). Exposure to this DMSO concentration also led to a browning in the not-cooled cells but not for those exposed to the liquid nitrogen (Fig. 5.4.). Together, those results indicate that, although not lethal, DMSO presented some toxicity for the cell cultures.

For those cells exposed to liquid nitrogen, only treatments with 15 or 20% DMSO showed significant recovery. In these cases, cells kept increasing after 6 weeks of culture when exposed to liquid nitrogen. However, only the use of 20% DMSO was able to recover the same amount of initial cell comparing with the not-cooled control (Fig. 5.3.). Moreover, in this treatment, the velocity of recovery was slow when compared with the control. The mass of cryopreserved cell reached the same amount of recovery for control with a week of delay comparing those treated with DMSO but not cooled (Fig. 5.4. and 5.2., respectively). Decreasing of mass could be reported during the first four weeks for cell cultures exposed to liquid nitrogen in several treatments (Fig. 5.4.).

Cell cultures used in this study are composed by pre-embryogenic masses. Like most of embryogenic cell of conifers presenting two types of cell, both induced from immature zygotic embryos: embryonic cell connected to the suspensor cell. The first one is compacted and characterized by highly dense cytoplasm and the second one is elongated and high vacuolated (STASOLLA; YEUNG, 2003). Morphological differences after thawing were found in cell cultures exposed to DMSO, compared to cells cooled without treatment and those treated before cooling and the difference of water content between these types of cells is important for their recovery. Usually, the suspensor cells die during cooling while embryonic cells survive storage in liquid nitrogen after appropriate treatments (HÄGGMAN; RUSANEN; JOKIPII, 2008). In the present work, cell culture *A. angustifolia* cooled without cryoprotectants showed

a more intense blue staining than those previously exposed to sorbitol and 20% DMSO and then cooled. However, both cell cultures that were cooled treated or not with sorbitol, showed a compact and wrinkled appearance compared with the control group not cooled or treated with sorbitol (Fig. 5.5.). Those results highlight the important but dual dilemma that exists in dehydrating the cell to avoid ice crystals without irreversible damage.

Most of experimental systems employed in cryopreservation like cell suspensions, calluses, shoot tips and embryos contain high amounts of cellular-free water being sensitive to freezing injury since most of them are not freeze-tolerant (Engelmann 2004). So, the material must be artificially dehydrated to protect from damage caused by crystallization of intracellular water into ice during cryopreservation procedures (MAZUR, 1977; REINHOUD; IREN; KIJNE, 2000).

The procedure applied in the present work was a classical cryopreservation method also known as two-step cooling, based on freeze-induced dehydration. During first step, temperature is reduced in a controlled way making cells and external medium supercooled followed by ice formation in the media (MAZUR; KOSHIMOTO, 2002; MAZUR, 1984). This happens because although the freezing point of cytoplasm is usually above -1 °C, cells generally remain unfrozen, and therefore supercooled, to -10 ° or -15 °C, even when ice is present in the external medium (MAZUR, 1965). This indicates that the cell membrane can prevent the growth of external ice into the supercooled interior, and further indicates that cells neither are, nor contain, effective nucleators of super-cooled water (MAZUR, 1970).

Since the temperature keeps falling, an increasing amount of extracellular solution is converted into ice, concentrating the intracellular solute. Because cells remain supercooled and their aqueous vapor pressure exceeds that of the frozen external compartment, water escapes from the cell to external ice (Engelmann 2004). After cells are sufficiently dehydrated, in the second step they are plunged into a liquid nitrogen bath and the cytoplasm vitrify (BENSON et al., 2012).

However, the intense freeze-induced dehydration can cause damage due to concentration of intracellular salts and changes in the cell membrane (MERYMAN; WILLIAMS; DOUGLAS, 1977). On the other hand, during rapid cooling, intracellular ice crystals may develop which can cause mechanical injuries (STEPONKUS; WEBB, 1992). In order to control the velocity of cooling, a system that allows cooling

in steps is required (ENGELMANN, 2004; PANIS; LAMBARDI, 2005). The use of precooled isopropyl alcohol (able to decrease the temperature at 1 °C.min⁻¹) was used in the first cooling step and is a cheaper alternative to controlled freezers. Thawing must be as fast as possible in order to avoid the phenomenon of recrystallization in which ice melts and reforms at a thermodynamically favorable rate, resulting in larger and more damaging crystal ice (MAZUR, 1984).

Cryoprotective compounds have been applied successfully since the early 1950s when 5 and 10% glycerol was used in a empiric use in order to cryopreserve mammalian semen (SZTEIN et al., 2001). The application of these compounds is essential for plant system cryopreservation with little or no natural tolerance of freezing helping prevent cell damage that can occur during cooling, storage or thawing (SAKAI; SUGAWARA, 1978). The use of the sorbitol and DMSO as cryoprotectant has been reported for cryopreservation of different conifers as reviewed in Ford et al (2000). According to the penetration in cell membrane, they can be classified as permeating and nonpermeating.

Permeating cryoprotectants are low molecular weight compounds such as glycerol, ethylene glycol, propylene glycol, and dimethylsulphoxide (DMSO) able to cross cell membranes (DAVIS et al., 2007). During freeze dehydration they rectify osmotic imbalance by penetration at the same time that exosmosis of water occurs (BENSON et al., 2012). In addition, permeating cryoprotectants lower the temperature of freezing point, prevent formation of intracellular ice crystals during freezing and avoid cellular damage during thawing (GONZALEZ-ARNAO et al., 2007; NASH, 1962). Then, water inside the cell decreases while an increase in the intracellular osmolality occurs until the cell is sufficiently dehydrated so that, upon plunging into a liquid nitrogen bath, the cytoplasm will vitrify (BENSON et al., 2012). Classic cryobiology studies suggest the use of glycerol or any permeating additive to efficiently protect cells from freezing injuries through colligative or "solution effects" or, in other words, the exposure of the cells to high salt concentrations for extended periods (CHEN et al., 1984).

Nonpermeating cryoprotectants are usually monosaccharides or disaccharides, like sorbitol, threalose and sucrose. Besides the induction of dehydration by increasing concentration of extracellular media, they aid in the shrinkage of cells during dehydration before and during cooling and control rehydration during the warming process reviewed in Davis et al. (2007). The purpose in this case is to minimize sugars from drying damage in desiccation-tolerant systems. In those systems, using dehydration, at intermediate water contents, a shell composed by water molecules is formed around the phospholipids head groups preventing damage in membrane. In a dry state, the shell disappears. Sugars then replace the water molecules, in order to maintain the space between phospholipid molecules maintaining a fluid liquid-crystalline state, in a reversible process when cell are rehydrated. However, if the amount of sugar is not sufficient to replace water from hydrate shell, the membrane results in the packing of phospholipid molecules and phase transition into gel phase. Then, membrane fluidity decreases and lateral phase separation can occur. In the case of changing physical-chemical properties in the membranes, irreversible damage can occur, resulting in leakage of cytoplasm solutes (HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001).

In the present work, since the velocity of cooling/thawing was the same for all treatments, the cell survival must be related to the concentration of DMSO applied in combination with sorbitol with the highest concentration of DMSO not just to avoid damage by ice crystals but also to possibly adjust the volume of the cell during dehydration, avoiding shrinkage and "solution effects". This hypothesis can be corroborated by the morphological aspects in that cell cultures of A. angustifolia exposed to freezing dehydration without cryoprotectants. Cells that could not be recovered or presented a negative recovery after thawing probably showed more compaction and higher penetration of Evans Blue dye. Living cells have higher dye exclusion of Evans Blue, compared to those with damaged membranes, which allows the entry of the dye (TAYLOR; WEST, 1979). Thus, evidence of a greater dye penetration can be considered a result of increased cell death by shrinkage and membrane damage. An alternative explanation for the loss of cell viability from injuries caused by solution effects could be the damage to the cytoskeleton, a network of fibrous elements that occurs during chilling. Microtubules were found as very sensitive to changes in temperature and sheer stress, and are vulnerable during cryopreservation. Chilling to 0 °C for only 1 min causes depolymerization of microtubules in both granulosa cells and the oocyte in mouse follicles (VANHOUTTE et al., 2004). Although there is a lack of information about plant cell cytoskeleton during cryopreservation procedures, studies found that cytoskeleton can be disrupted

in relative high water content during drying. The symptoms of this phenomenon are the protein aggregation and denaturation in dried desiccation-sensitive somatic embryos and in seeds of maturation-defective mutants (OSBORNE; BOUBRIAK; LEPRINCE, 2002). Then, the maintenance of cell shape can contribute to the recovery of the physiological functions. In addition, due to the cooperative action of both cryoprotectants, it must be more efficient with combined use rather than single use.

Although the most widely used cryoprotectant during cryopreservation protocols, the cytotoxicity of DMSO may result in a considerable tissue growth reduction. Typically, the compound is used in concentrations ranging between 5 and 10% (KARTHA et al., 1988). Then, the slow growth of cell cultures of *A. angustifolia* cryopreserved compared with the cell cultures not cooled exposed to concentrations of DMSO equal to or lower than 15% can indicate a toxicity of this cryoprotectant for this plant system. In this instance, the number of initial cells that would restore the culture might be reduced compared to the cell culture not exposed. This selection can also account for the recuperation of the original coloration of cells that presented browning when exposed to DMSO equal to or higher than 15% but not cooled.

According to the results, we conclude that the most promising protocol for the cryopreservation of cell culture of *A. angustifolia* is the combined use of sorbitol and DMSO 20%, since the amount of recovered cells was similar to the control not cryopreserved. Despite the fragility of *A. angustifolia* in nature, this is the first report of a procedure developed for the long-term conservation in this species. Furthermore, the use of *in vitro* model system could contribute to the understanding of biological basis of cryopreservation through direct observation of the cell. The study of desiccation and freezing tolerance of *A. angustifolia* cell cultures in different concentrations of DMSO showed that shrinkage can be directly related to maintenance of cell viability when cryoprotectants are not applied in an adequate concentration causing irreversible damage by physical-chemical changes in the membrane properties. Although widely studied in animals, the importance of the microtubule network is neglected in studies of cryopreservation in plants and presents opportunities for exploring and understanding damage to plant systems during cooling/thawing.

Figures

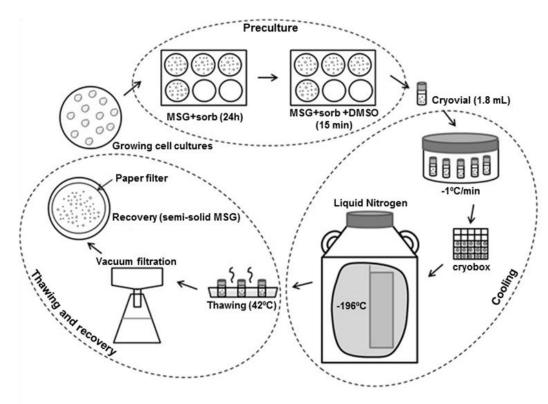


Figure 5.1. Methodology of cryopreservation of *A. angustifolia* cell culture, highlighting preculture, cooling, thawing and recovery. MSG (MSG media), sorb (sorbitol), DMSO (dimethylsulphoxide).

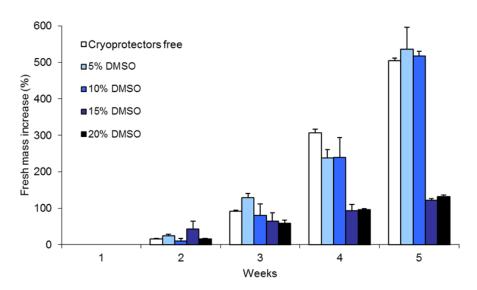


Figure 5.2. Mass increase of *A. angustifolia* during recovery after exposure to cryoprotectors but not cooled.

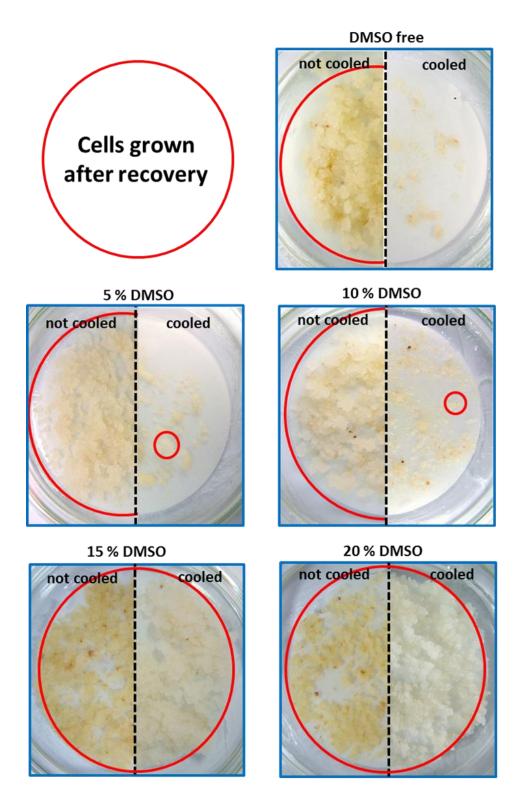


Figure 5.3. Recovery of cell culture of *A. angustifolia* after exposure to cryoprotectants not cooled (left) and exposure to cryoprotectants, cooling and LN (right).

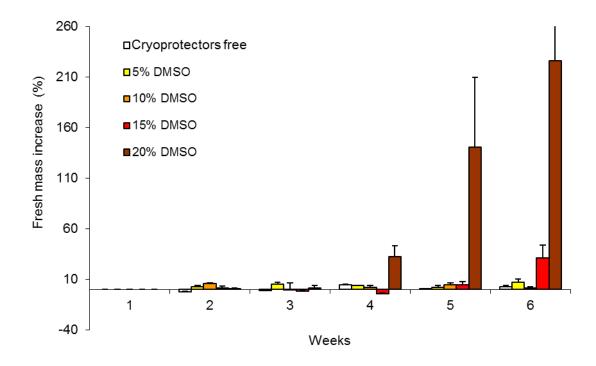


Figure 5.4. Mass increase of *A. angustifolia* during recovery after exposure to cryoprotectants, cooling and LN.

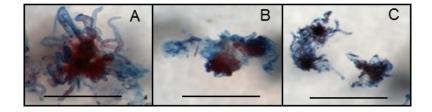


Figure 5.5. Cell culture of *A. angustifolia*, double stained with Evans blue and acetocarmine acid (2%) without exposure to cryoprotectors or cooled (control) (A); exposed to cell exposed to 0.4 M sorbitol and 20% DMSO, cooled and exposed to LN (B), cooled and exposed to LN without cryoprotectors (C). Bar = 1mm.

Acknowledgements This work was supported by FAPESP, CNPq and Petrobras.

References

ASTARITA, L.; GUERRA, P. M. Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia*—induction and maintenance of embryonal-suspensor mass cultures. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 10, p. 113–118, 1998.

BECWAR, M.; WANN, S.; JOHNSON, M. Development and characterization of in vitro embryogenic systems in conifers. **IPC Technical Paper Series**, n. 258, p. 1–17, 1987.

BENSON, J. D. et al. The cryobiology of spermatozoa. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1682–99, 2012.

CARVALHO, P.E.R. *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze: Pinheiro-do-Paraná. In: CARVALHO, P.E.R. (Ed.). **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA-CNPF, 1994. p. 70–78.

CHEN, T. H. et al. Freezing Characteristics of Cultured *Catharanthus roseus* (L). G. Don Cells Treated with Dimethylsulfoxide and Sorbitol in Relation to Cryopreservation. **Plant Physiology**, v. 75, n. 3, p. 720–725, 1984.

DAVIS, D. et al. Assisted Reproductive Technology: Laboratory Aspects. In: FALCONE, T.; HURD, W. (Eds.). **Assisted Reproductive Technology: Laboratory Aspects**. Philadelphia: Mosby, 2007. p. 900.

DOS SANTOS, A. L. et al. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia*. **Biologia Plantarum**, v. 52, n. 1, p. 195–199, 2008.

ENGELMANN, F. In vitro conservation of tropical plant germoplasm. **Euphytica**, v. 57, p. 227–243, 1991.

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

FORD, C. S.; JONES, N. B.; VAN STADEN, J. Cryopreservation and plant regeneration from somatic embryos of Pinus patula. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 6, p. 610–615, 2000.

FRETZ, A.; LÖRZ, H. Cryopreservation of in vitro Cultures of Barley (*Hordeum vulgare* L. and *H. murinum* L.) and Transgenic Cells of Wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Plant Physiology**, v. 146, n. 4, p. 489–496, 1995.

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**, v. 92, n. 1, p. 1–13, 2007.

GUERRA, M. P. et al. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (BERT) O. KTZE. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. (Eds.). **Somatic embryogenesis in woody plants**. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 457.

GUPTA, P. K.; DURZAN, D. J. Biotechnology of Somatic Polyembryogenesis and Plantlet Regeneration in Loblolly Pine. **Bio/Technology**, v. 5, n. 2, p. 147–151, 1987.

HÄGGMAN, H.; RUSANEN, M.; JOKIPII, S. Cryopreservation of in vitro tissues of deciduous forest trees. In: REED, B. M. (Ed.). **Cryopreservation: a practical guide**. [s.l.] Springer, 2008.

HARGREAVES, C. et al. Cryopreservation of Pinus radiata zygotic embryo cotyledons: effect of storage duration on adventitious shoot formation and plant growth after 2 years in the field. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 34, n. 3, p. 600–608, 2004.

HOEKSTRA, F. A; GOLOVINA, E. A; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 9, p. 431–438, set. 2001.

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. 2009.

KARTHA, K. Cryopreservation of Plant Cells and Organs. Boca Raton: CRC Press, 1985.

KARTHA, K. K. et al. Induction of Somatic Embryos and Plantlets from Cryopreserved Cell Cultures of White Spruce (*Picea glauca*). **Journal of Plant Physiology**, v. 132, n. 5, p. 529–539, 1988.

LAINE, E.; BADE, P.; DAVID, A. Recovery of plants from cryopreserved embryogenic cell suspensions of *Pinus caribaea*. **Plant Cell Reports**, v. 11-11, n. 5-6, p. 295–298, 1992.

LEITE, P.; KLEIN, R. Vegetação. In: **Geografia do Brasil - Região Sul**. Rio de Janeiro: IBGE, 1990. p. 2:113–150.

MAZUR, P. The Role of Cell Membranes in the Freezing of Yeast and Other Single Cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 125, p. 658–676, 1965.

MAZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. **Science**, v. 168, n. 3934, p. 939–949, 1970.

MAZUR, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology**, v. 14, p. 251–272, 1977.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal Physiology**, v. 247, n. 19, p. 1–4, 1984.

MAZUR, P.; KOSHIMOTO, C. Is intracellular ice formation the cause of death of mouse sperm frozen at high cooling rates? **Biology of reproduction**, v. 66, n. 5, p. 1485–1490, 2002.

MEDEIROS, J.; SAVI, M.; BRITO, B. Seleção de áreas para criação de Unidades de Conservação na Floresta Ombrófila Mista. **Biotemas**, v. 18, n. 2, p. 33–50, 2005.

MERYMAN, H. T.; WILLIAMS, R. J.; DOUGLAS, M. S. J. Freezing injury from "solution effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection. **Cryobiology**, v. 14, n. 3, p. 287–302, 1977.

MOTA, S.; CRAMER, E. O valor nutritivo do pinhão. **Engenharia e Química**, v. 5, n. 5, p. 1–9, 1953.

NAG, K.; STREET, H. Carrot Embryogenesis from Frozen Cultured Cells. **Nature**, v. 245, p. 270–272, 1973.

NASH, T. The Chemical Constitution of Compounds Which Protect Erythrocytes against Freezing Damage. **The Journal of General Physiology**, v. 46, n. 1, p. 167–175, 1962.

OSBORNE, D.; BOUBRIAK, I.; LEPRINCE, O. Rehydration of dried systems: membranes and nuclear genome. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. (Eds.). **Desiccation and Survival in Plants: Drying without Dying**. CAB Intern ed. Wallingford: [s.n.]. p. 343–364.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees)The role of biotechnology. Anais. Vila Gualino: 2005

PROCHNOW, M. O Parque Nacional das Araucárias e a Estação Ecológica da Mata Preta: Unidades de Conservação da Mata Atlântica. Rio do Sul: APREMAVI, 2009. p. 72

QUATRANO, R. S. Freeze-Preservation of Cultured Flax Cells Utilizing Dimethyl Sulfoxide. **Plant Physiology**, v. 43, p. 2057–2061, 1968.

REINHOUD, P.; IREN, F. VAN; KIJNE, J. Cryopreservation of undifferentiated plant cells. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Eds.). **Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm**. [s.l.] Japan Int. Res. Center for Agricultural Sciences, 2000. p. 91–97.

REITZ, R.; KLEIN, R. Flora ilustrada catarinense: araucariáceas. Itajaí: Sudesul, 1966. p. 62

ROBERTS, E. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v. 1, p. 499–514, 1973.

SAKAI, A.; SUGAWARA, Y. Survival of plant germoplasm in liquid nitrogen. In: SAKAI, A. (Ed.). Plant cold hardiness and freezing stress: mechanisms and crop implications. New York: Academic Press, 1978. p. 416.

- SANTOS, A. L. W. DOS et al. Somatic embryogenesis in parana pine (*Araucaria angustifolia*) (Bert.) O. Kuntze). **Brazilian archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 1, p. 97–106, 2002.
- SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 70–84, 2000.
- SANTOS, I. R. I. Ciopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência E Desenvolvimento**, v. 20, p. 60–65, 2001.
- SCHRIJNEMAKERS, E. W. M.; VAN IREN, F. A two-step or equilibrium freezing procedure for the cryopreservation of plant cell suspensions. In: MR, M.; JG, D. (Eds.). **Cryopreservation and freeze drying protocols**. Totowa: Humana Press, 1995. p. 103–112.
- STASOLLA, C.; YEUNG, E. C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, n. 1, p. 15–35, 2003.
- STEFENON, V. M. et al. Evidences of delayed size recovery in *Araucaria angustifolia* populations after post-glacial colonization of highlands in Southeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, n. 3, p. 433–443, 2008.
- STEPONKUS, P. L.; WEBB, M. S. Freeze- induced dehydration and membrane destabilization in plants. In: SOMERO, G. N.; OSMOND, C. B.; BOLIS, C. L. (Eds.). Water and life: comparative analysis of water relationships at the organismic, cellular and molecular. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 1992. p. 338–362.
- SZTEIN, J. M. et al. Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. **Cryobiology**, v. 42, n. 1, p. 28–39, 2001.
- VANHOUTTE, L. et al. Effects of chilling on structural aspects of early preantral mouse follicles. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 4, p. 1041–1048, 2004.