

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

**ESTUDOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS PARA
CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE
COQUEIRO ANÃO VERDE DE JIQUI DO BRASIL**

KICIA KARINNE PEREIRA GOMES COPELAND

SÃO CRISTÓVÃO

2010

KICIA KARINNE PEREIRA GOMES-COPELAND

**ESTUDOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS PARA
CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE COQUEIRO
ANÃO VERDE DE JIQUI DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia na área de concentração Biotecnologia em Recursos Naturais.

Orientadora

Dra. Ana da Silva Lédo

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE - BRASIL
2010

KICIA KARINNE PEREIRA GOMES-COPELAND

**ESTUDOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS PARA
CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE COQUEIRO
ANÃO VERDE DE JIQUI DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia na área de concentração Biotecnologia em Recursos Naturais.

APROVADA em 30 de julho de 2010

Dra. Izulmé Rita Imaculada Santos – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Profa. Dra. Roberta Pereira Miranda Fernandes – Universidade Federal de Sergipe

Profa. Dra. Ana da Silva Lédo
Embrapa Tabuleiros Costeiros/UFS
(Orientadora)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE - BRASIL

Ao meu marido, Klésio Copeland, pelo companheirismo, incentivo e amor nessa minha jornada.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar saúde, coragem e força para alcançar os meus objetivos.

Aos meus pais e irmãos pelo amor incondicional, carinho e compreensão pela minha ausência em muitos momentos. Amo muito vocês!

Ao meu marido que sempre me acompanhou em tudo, pelas palavras que nunca o faltaram para me incentivar, tranquilizar e encorajar. Amo muito você!

Ao meu sogro, que desde o início, me deu força e incentivo nos momentos em que eu mais precisava. Obrigada.

A toda a minha família Copeland, pelo carinho e por fazerem minha vida mais feliz. Amo vocês.

À Dra. Ana Lédo, pela orientação, confiança, apoio e ensinamentos. Obrigada.

À Dra. Izulmé Santos, por todos os ensinamentos, além de ser sempre uma pessoa acessível e carinhosa.

A todos do laboratório de criobiologia, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelos momentos de alegria e descontração em todo o período de convivência. Obrigada.

Às minhas amigas, Micaele, Daniela, Jéssica, Marília pelo companheirismo, incentivo, carinho, e que além das madrugadas de estudos, compartilhamos diversos momentos de descontração e alegria. Amigas obrigada por tudo! Adoro vocês!

A Inácio, por toda a ajuda, dedicação, amizade e sinceridade em suas palavras. Obrigada.

Aos estagiários do laboratório de cultura de tecidos de plantas, Lucas, Rodrigo e Zilná pelos momentos de descontração, fazendo com que os meus dias no laboratório se tornassem mais leves.

Ao amigo Bruno, por contribuir em tudo o que fosse necessário para o desenvolvimento do meu trabalho, pela paciência, palavras de incentivo e orientação. Obrigada por tudo.

Aos analistas, Daniel de Oliveira, Robson Dantas, Robinson Júnior, da Embrapa Tabuleiros Costeiros, pela ajuda e apoio para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada.

À professora Roberta, que por muitas vezes disponibilizava o seu curto tempo para ouvir as minhas dúvidas, contribuindo muito para a minha formação como pessoa e profissional.

À Embrapa Tabuleiros Costeiros por possibilitarem o desenvolvimento dessa pesquisa.

A Universidade Federal de Sergipe e aos professores do Núcleo de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade e acesso a novos conhecimentos.

A FAPITEC-SE e ao CNPq, pela concessão de bolsas de estudo.

Enfim, a todos aqueles que, de alguma forma, auxiliaram na realização deste trabalho, o meu reconhecimento e a minha gratidão.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 Biotecnologia e biodiversidade	03
2.2 Recursos genéticos no Brasil e no mundo	03
2.3 Aspectos gerais do coqueiro	04
2.4 Importância econômica do coqueiro no Brasil e no mundo	04
2.5 Conservação <i>in vitro</i> de recursos genéticos	05
2.6 Criopreservação de recursos genéticos de coqueiro	07
2.7 Vitrificação	08
2.8 Aspectos bioquímicos e fisiológicos durante o processo de criopreservação	09
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Coleta e excisão dos embriões zigóticos maduros de coco AveJBr	11
3.2 Desidratação dos embriões zigóticos de coco AveJBr	11
3.2.1 Efeito do tempo e de crioprotetores na desidratação de embriões zigóticos de coco AveJBr em câmara de fluxo laminar e em sílica gel	11
3.2.2 Efeito do tempo e de crioprotetores na desidratação de embriões zigóticos de coco AveJBr	12
3.2.3 Recuperação de embriões criopreservados	15
3.3 Testes bioquímicos e fisiológicos	15
3.3.1 Teste de condutividade elétrica	15
3.3.1.1 Determinação do tempo de incubação e tamanho da amostra (controle)	15
3.3.1.2 Condutividade elétrica em embriões criopreservados submetidos a pré-tratamentos com crioprotetores	15
3.3.2 Teste de lixiviação de potássio	16
3.3.2.1 Determinação do tamanho da amostra (Controle)	16

3.3.2.2	Lixiviação de potássio em embriões criopreservados submetidos a pré-tratamentos com crioprotetores	16
3.3.3	Testes com tetrazólio	16
3.3.3.1	Determinação da concentração de tetrazólio (Controle)	16
3.3.3.2	Teste de tetrazólio em embriões criopreservados submetidos a pré-tratamentos com crioprotetores	17
3.4	Análises estatísticas	18
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1	Desidratação dos embriões zigóticos de coco AveJBr	19
4.1.1	Efeito do tempo e de crioprotetores na desidratação de embriões zigóticos de coco AveJBr em câmara de fluxo laminar, sílica gel e metodologia CPATC	19
4.2	Testes bioquímicos e fisiológicos	22
4.2.1	Teste de condutividade elétrica	22
4.2.1.1	Controle	22
4.2.2	Teste com tetrazólio	26
4.2.4	Recuperação de embriões criopreservados	28
5	CONCLUSÕES	33
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxograma da avaliação do efeito do tempo de desidratação de embriões zigóticos de coco AveJBr em câmara de fluxo laminar e sílica gel	13
Figura 2	Fluxograma da avaliação do efeito do tempo de desidratação de embriões zigóticos de coco AveJBr usando metodologia CPATC	14
Figura 3	Porcentagens da área do embrião com coloração vermelha utilizadas para avaliar a viabilidade de embriões zigóticos de coco AveJBr	17
Figura 4	Efeito dos crioprotetores no meio de pré-tratamento em câmara de fluxo laminar na desidratação dos embriões zigóticos de coco AveJBr. Cada coluna representa a média de três repetições \pm erro padrão da média	20
Figura 5	Efeito dos crioprotetores no meio de pré-tratamento em sílica gel na desidratação dos embriões zigóticos de coco AveJBr. Cada coluna representa a média de três repetições \pm erro padrão da média	21
Figura 6	Efeito dos crioprotetores no meio de pré-tratamento adaptado na desidratação dos embriões zigóticos de coco AveJBr. Cada coluna representa a média de três repetições \pm erro padrão da média	21
Figura 7	Efeito do tempo de incubação e do tamanho da amostra na massa fresca de embriões zigóticos de coco AveJBr. Cada coluna representa a média de três repetições \pm erro padrão da média	23
Figura 8	Condutividade elétrica em três amostras de embriões zigóticos de coco AveJBr criopreservados. Cada coluna representa a média de três repetições \pm erro padrão da média	25
Figura 9	Condutividade elétrica dos embriões zigóticos de coco AveJBr criopreservados após 24 horas de incubação em função dos tratamentos de crioproteção	25
Figura 10	Lixiviação de potássio dos embriões de coco AveJBr criopreservados após 24 horas de incubação em função dos tratamentos de crioproteção	26
Figura 11	A-Teste de tetrazólio em embriões zigóticos de coco AveJBr; B-germinação de embriões zigóticos aos 90 dias (controle)	27
Figura 12	Viabilidade dos embriões zigóticos de coco AveJBr em função dos tratamentos de crioproteção após a criopreservação. Cada coluna representa a média de três repetições \pm erro padrão da média	28
Figura 13	Desenvolvimento de embriões zigóticos de coco AveJBr (NL-) aos 30 dias na etapa de recuperação em meio líquido Y3. A) T-testemunha; T1- 12hT1; T2- 12hT2; T3- 12hT3; T4- 12hT4 B) T-testemunha; T1- 16hT1; T2- 16hT2; T3- 16hT3; T4- 16hT4 C) T-testemunha; T1- 20hT1; T2- 20hT2; T3- 20hT3; T4- 20hT4	29
Figura 14	Desenvolvimento de embriões zigóticos de coco AveJBr (NL+) aos 30 dias na etapa de recuperação em meio líquido Y3. A) T-testemunha; T1- 12hT1; T2- 12hT2; T3- 12hT3; T4- 12hT4 B) T-testemunha; T1- 16hT1; T2- 16hT2; T3- 16hT3; T4- 16hT4 C) T-testemunha; T1- 20hT1; T2-	30

20hT2; T3- 20hT3; T4- 20hT4

Figura 15 Desenvolvimento de embriões zigóticos de coco AveJBr (NL-) à esquerda e (NL+) à direita aos 60 dias na etapa de recuperação em meio líquido Y3. A) T1- 12hT1; T2- 12hT2; T3- 12hT3; T4- 12hT4 B) T1- 16hT1; T2- 16hT2; T3- 16hT3; T4- 16hT4 C) ; T1- 20hT1; T2- 20hT2; T3- 20hT3; T4- 20hT4; D) T- testemunha; T1- 12hT1; T2- 12hT2; T3- 12hT3; T4- 12hT4 E) T-testemunha; T1- 16hT1; T2- 16hT2; T3- 16hT3; T4- 16hT4 F) T-testemunha; T1- 20hT1; T2- 20hT2; T3- 20hT3; T4- 20hT4

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeito do tempo de desidratação de embriões zigóticos de coco AveJBr em câmara de fluxo laminar, sílica gel e em metodologia CPATC em quatro diferentes pré-tratamentos. Aracaju, Embrapa, 2010	20
Tabela 2	Massa fresca dos embriões não criopreservados de coco AveJBr em função do tempo de incubação e do tamanho da amostra. Aracaju, Embrapa, 2010	22
Tabela 3	Condutividade elétrica em três amostras de embriões de coco AveJBr não criopreservados. Aracaju, Embrapa, 2010	24
Tabela 4	Viabilidade dos embriões criopreservados de coco AveJBr submetidos a quatro pré-tratamentos de crioprotetores usando o teste de tetrazólio. Aracaju, Embrapa, 2010	27

RESUMO

GOMES-COPELAND, Kicia Karinne Pereira. **Estudos fisiológicos e bioquímicos para criopreservação de embriões zigóticos de coqueiro anão verde de Jiqui do Brasil.** Sergipe: UFS, 2010. 51p. (Dissertação – Mestrado em Biotecnologia)

A cultura do coco (*Cocos nucifera* L.) tem uma importância significativa, por gerar emprego e renda durante todo o ano. Os bancos de germoplasma *in vitro* oferecem vários benefícios, tais como altas taxas de multiplicação, produção de matrizes livres de patógenos, redução da erosão genética, redução da demanda por espaço, redução de custos com a mão de obra, e simplificação do intercâmbio internacional de germoplasma. Portanto, a conservação a longo prazo supri essas necessidades, como também pode ser utilizado para conservar espécies recalcitrantes e intermediárias. Este trabalho tem como objetivos, a conservação em longo prazo de embriões zigóticos maduros de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) anão verde de Jiqui do Brasil, em nitrogênio líquido a -196 °C; adaptar a aplicação de testes de tetrazólio, condutividade elétrica e lixiviação de potássio para estudos da viabilidade de embriões criopreservados; e analisar a viabilidade dos embriões após a criopreservação. Foram utilizados embriões zigóticos de frutos com 11 meses de maturação provenientes de um plantio de Coqueiro Anão Verde de Jiqui do Brasil (AveJBr). Cilindros de endosperma com embriões zigóticos foram acondicionados em recipientes estéreis e encaminhados para o Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, Sergipe. Foram avaliados os efeitos de diferentes tempos de desidratação, tratamentos de crioprotetores e tipos de secagem na umidade dos embriões utilizando a metodologia de Assy-Bah e Engelmann (1992) e metodologia CPATC. Testes de condutividade elétrica, lixiviação de potássio e tetrazólio foram realizados para avaliar a viabilidade dos embriões zigóticos após a criopreservação. Após a seleção do método CPATC, embriões zigóticos de coqueiro AveJBr foram criopreservados e após 48 horas foram submetidos a etapa de recuperação em meio de cultura Y3 líquido. A metodologia CPATC com a desidratação inicial dos embriões em crioprotetores e posterior secagem em sílica gel por quatro horas promove as menores umidades nos embriões zigóticos maduros de coco AveJBr. O pré-tratamento de embriões zigóticos maduros de coco AveJBr com crioprotetor com 1,75 mol.L⁻¹ de sacarose + 15% de glicerol por 12 e 16 horas promove a menor umidade dos embriões, como também maior viabilidade em testes de condutividade elétrica, lixiviação de potássio e tetrazólio. Amostras com 10 embriões é suficiente para análise de condutividade elétrica em embriões zigóticos de coco AveJBr criopreservados ou não. O período de incubação de embriões de quatro a oito horas é promissor para análise condutividade elétrica em embriões zigóticos maduros de coco AveJBr não criopreservados. A concentração de 0,25% de tetrazólio é indicada para análise de viabilidade de embriões zigóticos maduros de coco AveJBr criopreservados ou não. O período de 90 dias não é suficiente para avaliação da germinação de embriões criopreservados.

Palavras-chave: *Cocos nucifera* L.; recursos genéticos; membrana celular e bioquímica.

Comitê de Orientação: Ana da Silva Léo – Embrapa Tabuleiros Costeiros

ABSTRACT

GOMES-COPELAND, Kicia Karinne Pereira. Physiological and biochemical studies for cryopreservation of zygotic embryos of dwarf green coconut-tree Jiqui of Brazil. Sergipe: UFS, 2010. 51p. (Dissertation - Master in Biotechnology)

The culture of coconut (*Cocos nucifera* L.) has a significant importance in generating employment and income throughout all the year. The *in vitro* germplasm banks offer several benefits, such as high rates of multiplication, production of arrays free of pathogens, reduction of genetic erosion, reduced demand for space, cost savings with the workforce and facilitating international exchange of germplasm. Therefore, the long-term conservation address these needs, but can also be used to keep recalcitrant and intermediate species. This paper aims at the long-term retention of mature zygotic embryos of dwarf green coconut-tree Jiqui of Brazil (*Cocos nucifera* L.) in liquid nitrogen at -196 celcius degrees; adapt the application of tetrazolium tests, electrical conductivity and potassium leaching to study the feasibility of cryopreserved embryos and to analyze the viability of embryos after cryopreservation. Zygotic embryos of fruits from a planting of dwarf green coconut-tree Jiqui of Brazil (AveJBr) with 10 at 11 months of maturation were used. Endosperm cylinders with zygotic embryos were placed in sterile containers and sent to the Plant Tissue Culture Laboratory of Embrapa Coastal Tablelands, Aracaju, Sergipe. We evaluated the effects of different periods of dehydration, treatment of cryoprotectants and drying methods on moisture from embryos using the methodology of Assy-Bah & Engelmann (1992) and CPATC methodology. Electrical conductivity tests, potassium leaching and tetrazolium were performed to evaluate the feasibility of zygotic embryos after cryopreservation. After selecting the adapted method from dehydration, AveJBr coconut zygotic embryos were cryopreserved and after 48 hours underwent to a recovery stage in culture medium Y3 liquid. The CPATC methodology with the initial dehydration of embryos in cryoprotectant and subsequent drying in silica gel for four hours promotes lower humidities in mature zygotic embryos of coconut AveJBr. The pre-treatment of mature zygotic embryos of coconut AveJBr with cryoprotectant with 1.75 mol L⁻¹ sucrose + 15% glycerol for 12 and 16 hours promotes lower humidity of the embryos, but also higher viability in electrical conductivity , potassium leaching and tetrazolium. Samples with 10 embryos are sufficient for analysis of electrical conductivity in zygotic embryos of coconut AveJBr not cryopreserved. The incubation period of four to eight hours of embryos is promising for the electrical conductivity analysis in mature zygotic embryos of coconut AveJBr not cryopreserved. The concentration of 0.25% of tetrazolium is indicated for the viability analysis of mature zygotic embryos of coconut AveJBr not cryopreserved. The period of 90 days is not sufficient to the germination evaluation of cryopreserved embryos.

Keywords: *Cocos nucifera* L.; genetic resources; cell membrane and biochemistry.
Steering Committee: Ana da Silva Léo - Embrapa Coastal Tablelands

1 INTRODUÇÃO

O coqueiro é uma palmeira encontrada em todos os trópicos, mas tem como origem a Ásia. É uma cultura típica de clima tropical, por isso seu habitat natural é às margens da costa litorânea, apesar de ainda ser encontrados em solos argilosos até moderadamente ácido a alcalino (CHAN et al., 2006). No Brasil, seu cultivo se desenvolve, principalmente, ao longo do litoral, estendendo-se do Pará até o Espírito Santo. O Brasil é atualmente o quarto maior produtor de coco do mundo, sendo a região nordeste onde se concentra a maior parte dessa produção. Entre os estados produtores nordestinos, se destacam Bahia e Ceará, e Sergipe na quinta posição.

Do ponto de vista sócio-econômico, a cultura do coco tem uma importância significativa, por gerar emprego e renda durante todo o ano. Isso é explicado pelo fato da cultura ser matéria-prima de uma gama de produtos alimentícios, bem como ser utilizada na área de artesanato, mostrando a possibilidade de aproveitamento total do fruto. Além disso, também permite o consórcio com outras culturas como abacaxi, mandioca, maracujá, abóbora, entre outras, e até mesmo a criação de animais, contribuindo assim para a permanência do homem do campo.

No entanto, o setor de coco vem enfrentando diversos problemas que afetam diretamente a sua produtividade. Isso ocorre principalmente devido ao uso de plantas sem seleção, a idade avançada dos plantios e a ocorrência de várias pragas e doenças que ainda continuam com pouco ou nenhum tratamento fitossanitário. A ausência de cultivares selecionadas se deve ao fato dos programas de melhoramento genético serem demorados e complexos devido ao longo ciclo, hábito de crescimento e ausência de métodos de propagação vegetativa.

Neste contexto, a cultura de tecidos, quando integrada a um programa de melhoramento, torna-se um instrumento valioso na obtenção de plantas livre de vírus, fungos e bactérias, na clonagem rápida de genótipos superiores, no intercâmbio e conservação de germoplasma.

Assim a formação de bancos de germoplasma *in vitro* é de grande valia por trazer diversos benefícios, tais como altas taxas de multiplicação, produção de matrizes livres de patógenos, redução da demanda por espaço, manutenção da viabilidade de estruturas organizadas, baixo custo, entre outras. A conservação em longo prazo, também conhecida por criopreservação pode suprir essas necessidades, além da sua aplicabilidade para conservação de espécies recalcitrantes, como o coqueiro.

A criopreservação é definida como conservação de material biológico em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, ou em fase de vapor a $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$. Inúmeras espécies já tem sido criopreservadas com sucesso. Os primeiros trabalhos de criopreservação de coqueiro foram conduzidos em 1992 por Assy-Bah e Engelmann. Entretanto, não existem resultados de pesquisa sobre o desempenho da técnica para cultivares como o coqueiro gigante do Brasil e anão verde de Jiqui do Brasil, necessitando de protocolos específicos para sua conservação.

A capacidade de tecidos vegetais sobreviverem à criopreservação depende da sua tolerância à desidratação e a baixa temperatura, uma vez que estes fatores podem afetar irreversivelmente a membrana celular, com conseqüente morte do tecido. Por essa razão são importantes, para o desenvolvimento de protocolos, estudos bioquímicos e fisiológicos associados a esses estresses para prever os possíveis danos causados diretamente na membrana, como também reduzir custos de condução de grandes experimentos inicialmente. Testes de respostas rápidas como os de condutividade elétrica, lixiviação de potássio e tetrazólio que são largamente utilizados em sementes, podem ser adaptados para a análise de viabilidade de explantes como sementes e embriões zigóticos criopreservados.

Este trabalho tem como objetivos a conservação em longo prazo de embriões zigóticos maduros de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) anão verde de Jiqui do Brasil, em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$; adaptar a aplicação de testes de tetrazólio, condutividade

elétrica e lixiviação de potássio para estudos da viabilidade de embriões criopreservados; e analisar a viabilidade dos embriões após a criopreservação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biodiversidade e Biotecnologia

Estima-se que cerca de 100 mil plantas, representam aproximadamente um terço de todas as espécies vegetais do mundo, estando elas ainda, no seu estado selvagem, ameaçadas ou em perigo de extinção (BGCI, 2005 citado por ZHU et al., 2006). Por essa razão, técnicas para conservar essas espécies introduzindo-as em programas clássicos e modernos de melhoramento de plantas, são necessárias. Além da importância dessa biodiversidade como fonte de compostos para as indústrias farmacêutica, alimentícia e industrial.

Biodiversidade ou diversidade biológica é a variabilidade de organismos vivos de todas as origens e os complexos ecológicos de que fazem parte, compreendendo a diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas. Segundo dados da ONG *Conservation International*, estima-se que haja no território brasileiro cerca de 20% do número total de espécies do planeta, somente no Brasil, cerca de 60 mil espécies são descritas de plantas superiores (20 a 22% do total mundial) (AZEVEDO, 2009).

A biotecnologia utilizada criteriosamente como instrumento de promoção do desenvolvimento sustentável contribuirá para a solução de problemas que hoje representam riscos potenciais à sociedade e ao ambiente. A biotecnologia poderá promover o aumento da produtividade agrícola, gerar novas técnicas de controle biológico, melhorar o teor nutritivo dos alimentos e possibilitar avanços no setor da terapêutica. Uma vez que faz uso da biodiversidade com o objetivo de gerar produtos mais eficazes e de maior valor agregado, possibilita que o imenso potencial genético existente no País seja utilizado com maior eficácia e de forma diversificada (MCT, 2009).

2.2 Recursos genéticos no Brasil e no mundo

O recurso genético é uma parte essencial da biodiversidade, onde é usado pelo homem para promover o desenvolvimento sustentável da agricultura e produção de alimentos. Esses recursos estão contidos numa diversidade de material genético em variedades tradicionais, cultivares modernas, cultivares relativamente selvagem e outras espécies selvagens.

Cerca de 30 mil espécies de plantas são comestíveis e sete mil são cultivadas ou coletadas pelo homem para sua alimentação, vestuário, moradia e saúde em todo ou qualquer tempo (WILSON, 1988; HEYWOOD, 1995). É importante ressaltar que em 2020 a população mundial será de oito bilhões, portanto, a produção por grãos deverá ser duplicada em cerca de cinco bilhões de toneladas por ano, sendo necessário o melhor uso de uma ampla classe da diversidade genética de plantas do mundo (RAO, 2004).

Apesar disso, no Brasil, a agricultura e a segurança alimentar da população ainda dependem da introdução de recursos genéticos de outros países. O fato de ser um país rico em biodiversidade, não significa que é auto-suficiente em recursos genéticos vegetais. Por essa razão, a importação sistemática e crescente desses recursos é de suma importância para o desenvolvimento sustentável de um país (GOEDERT, 2007). A pesquisa voltada para o desenvolvimento de novas variedades vegetais e raças animais necessitará de materiais genéticos que apresentam características de adaptação ecológica, como, por exemplo, resistência às pragas e doenças e a adaptação às condições adversas do ambiente (GIACOMETTI, 1993).

A Rede Nacional de Recursos Genéticos atualmente mantém 383 Bancos Ativos de Germoplasma de Plantas (BAGs), dos quais 140 estão no sistema Embrapa e 243 em outras instituições do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA). Destes BAGs, 52% conservam apenas espécies exóticas, enquanto que 32% apenas espécies nativas e os restantes 16% ambas as categorias de espécies. A alta proporção de

espécies exóticas nestes BAGs é um indicativo da sua importância para a agricultura no Brasil (MARIANTE et al., 2009).

Portanto, o uso de recursos genéticos, como fonte para a criação de novas variedades, é fator fundamental para se alcançar uma produtividade mais elevada, como também, para as transformações tecnológicas verificadas no processo de modernização do agronegócio. É importante fortalecer as iniciativas para a conservação de espécies em seus habitats naturais e entre as populações tradicionais de agricultores e comunidades indígenas (conservação *on farm*), e de forma integrada com o sistema formal de conservação *ex situ* é de grande importância para objetivar esse desenvolvimento tão esperado pelo mundo (GOEDERT, 2007).

2.3 Aspectos gerais do coqueiro

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma palmeira tropical que se encontra distribuída mundialmente em mais de 90 países na região intertropical, apresentando melhor desenvolvimento em condições de temperatura em torno de 27 °C, não tolerando temperaturas inferiores a 15 °C (SILVA, 2002). É considerada como uma das plantas de maior utilidade ao homem, pois é capaz de gerar um sistema auto-sustentável de exploração, proporcionando emprego e renda, além de servir como fonte básica da alimentação em vários países asiáticos. Além da sua importância paisagística, toda a planta pode ser aproveitada, desde a raiz ao fruto, gerando mais de 100 produtos ou subprodutos (BENASSI, 2009).

A origem do coqueiro é bem discutida, pois alguns relatos afirmam sua origem na Índia, outros nas Ilhas do Pacífico, e outros autores ainda mencionam a África. Como consenso considera-se que o coqueiro seja originário do Sudeste Asiático (SILVA, 2002).

O coqueiro pertence à família *Arecaceae*, da classe das monocotiledôneas, o gênero *Cocos* é constituído apenas pela espécie *Cocos nucifera* L., a qual é composta de algumas variedades, gigante (*Typica*), anã (*Nana*) e híbrido, este último resultante dos cruzamentos entre as duas primeiras variedades, os quais apresentam os híbridos mais utilizados. As variedades são geralmente nomeadas de acordo com a sua suposta localidade de origem.

2.4 Importância econômica do coqueiro no Brasil e no mundo

Na última década, o cultivo mundial de coqueiro registrou acréscimos, tanto na produção, quanto na área colhida. Em 1995 a produção mundial foi de 48,9 milhões de toneladas, numa área colhida de 10,6 milhões de hectares, enquanto que, no ano de 2004 a produção foi, aproximadamente, de 53,5 milhões de toneladas em uma área colhida de 10,7 milhões de hectares, representando um incremento de 9,4% na produção e de apenas cerca de 1,0% na área colhida (BENASSI, 2009).

Entre os principais produtores a Indonésia é maior produtor mundial (2.600 mil toneladas), seguido por Filipinas e Índia com 1.600 mil toneladas e 736 mil toneladas de produção em 2008/09, respectivamente (AGRIANUAL, 2009). Nestes países, o coqueiro é explorado, basicamente, para produção de copra (albúmen sólido desidratado a 6%) e óleo, produto este que vem enfrentando dificuldades de comercialização tendo em vista a competição com outros tipos de óleos mais baratos e saudáveis como o de girassol e o de soja (FONTENELLE, 2005). O Brasil é o quarto maior produtor mundial com uma produção de 11.818 mil frutos, em uma área colhida de 271 mil hectares (AGRIANUAL, 2009). Dentre os estados brasileiros, os que mais se destacam são: Bahia com 593.401 mil de frutos; Ceará com 253.663 mil de frutos; e Sergipe, ocupando a quinta posição com 87.509 mil de frutos. Estes Estados representam 52,9% da produção nacional de coco (AGRIANUAL, 2009). Rio Grande do Norte, Alagoas, Pernambuco, Paraíba,

maranhão, Rio de Janeiro e Espírito Santos, apesar de volumes menos expressivos, também contribuem para o aumento da produção nacional.

A expansão acelerada da cultura do coco no Brasil, nos últimos anos, decorre, sobretudo, do incremento da comercialização do coco verde para atender o crescente mercado da água-de-coco. Este mercado ganhou espaço como alternativa para os produtores que se descapitalizaram mediante o aumento das importações de coco ralado. Informações do Ministério da do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior demonstram que de 2007 para 2008 houve uma redução de 6.632 hectares (-2,4%) na área plantada, e de 2006 para 2008 de 12.623 hectares (-4,5%). A produção total variou negativamente constatando uma diminuição de 28.727 frutos na produção ao longo desses anos. Entre os anos de 2007 e 2008 não observou-se aumento da área plantada, pelo contrário, houve uma diminuição de 1,4%, entretanto, a produção de coco seco aumentou 1%. De uma forma geral a produção nacional de 2006 a 2008 aumentou 3% (BRASIL, 2009).

2.5 Conservação *in vitro* de recursos genéticos

Diversos procedimentos biotecnológicos vêm sendo desenvolvidos ao longo dos anos e o ramo da cultura de tecidos é um dos que mais prosperou. A cultura de tecidos como ferramenta pode auxiliar diversas áreas do conhecimento tais como fitopatologia, fisiologia, engenharia genética, química, citogenética, bioquímica, biologia molecular, em estudos básicos da biologia de plantas que abrange recentes e importantes métodos que permitem a propagação de plantas isentas de vírus e outros patógenos sistêmicos ou não, além de poder gerar novos genótipos em laboratório (SOUZA et al., 2006). Permite ainda aperfeiçoar a interação entre fatores abióticos (nutricionais, luminosos, temperatura etc.) e bióticos (hormonais e genéticos), resultando em plantas saudáveis, vigorosas e geneticamente superiores, que podem ser multiplicadas massivamente.

A técnica de cultura de tecidos é baseada na totipotencialidade da célula vegetal, ou seja, na sua capacidade de, por si só, originar uma nova planta, devido às mesmas apresentarem em seu núcleo, toda informação genética (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

A cultura de tecidos tem como princípios básicos para a obtenção de culturas assépticas de plantas a escolha do explante, a assepsia, o meio nutritivo e as condições ambientais de cultivo. Como fontes de explantes são usados ápices caulinares, ápices radiculares, gemas axilares ou gemas laterais, segmentos foliares, cotilédones e entrenós, anteras, ovários, óvulos, nucelos, embriões zigóticos, inflorescências e, inclusive, tecidos altamente diferenciados, como os provenientes de frutos (MROGINSKI & ROCA, 1991; BARRUETO CID, 2001; MORAES et al., 2007).

O uso da cultura de tecidos vem crescendo para a conservação de recursos genéticos de plantas, pelo fato de propiciar a manutenção de um grande número de acessos em espaço físico reduzido, fidelidade genética, além de plantas livres dos riscos que existem em condições *ex vitro*. Segundo Withers et al. (1998), a manutenção desses acessos em bancos de germoplasma em condições de campo tem como desvantagens a sua vulnerabilidade, pois estas plantas são expostas ao ataque de patógenos, a intempéries climáticas ou ao vandalismo, podendo ser perdidas por falhas na identificação ou erros humanos. Além disso, manutenção *in vivo* é onerosa, pois são necessárias grandes áreas para o plantio, mão-de-obra, além de poder ser prejudicada em períodos de dificuldades econômicas.

Por isso, a conservação de germoplasma *in vitro* torna-se atraente, não só por motivos econômicos, como práticos. Podendo ser feita a partir de mudanças no ambiente de cultivo para desacelerar ou suprimir totalmente o crescimento de células, tecidos e órgãos (LÉDO et al., 2007). Segundo George (1993), o objetivo é aumentar ao máximo o período de subcultivo ou estendê-lo indefinidamente, dessa forma se reduz a mão-de-

obra e o espaço necessários, além de proporcionar ao melhorista acesso imediato a todo o germoplasma da coleção.

Existem duas técnicas de conservação de germoplasma: por crescimento lento, que utiliza retardantes de crescimento, diminuição da temperatura, e/ou redução dos nutrientes do meio de cultura, mantendo o material armazenado de seis a 12 meses, que pode ser considerado satisfatório para conservação em curto prazo; e criopreservação, onde o material fica armazenado em longo prazo em tambores de nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ (fase de vapor).

Vários são os agentes osmóticos utilizados como retardante de crescimento, manitol, sorbitol e a sacarose são alguns deles (LÉDO et al., 2007). Desses, o manitol é o mais utilizado na conservação *in vitro* na maioria das espécies, por apresentar bons resultados retardantes no crescimento da maioria delas, pois quando adicionado ao meio de cultura reduz seu potencial hídrico. De acordo com Withers e Williams (1998), a concentração de 4% de manitol tem sido utilizada com sucesso para conservar propágulos de espécies de propagação clonal como tubérculos, raízes e fruteiras temperadas. A redução da concentração de sais minerais no meio de cultura e de sacarose também permite a manutenção de plântulas em crescimento mínimo (MALAURIE & BORGES, 2001). Lemos et al. (2002), testando o uso de temperaturas mais baixas, de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ para 15°C no cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar, induziram o crescimento mais lento dos explantes sem danos fisiológicos.

Cerca de 20 espécies de inhame (*Dioscorea* spp.) são conservadas no Instituto de Pesquisa para o Desenvolvimento (IRD), em Montpellier, França, sob condições de crescimento lento, com subcultivos de seis a oito meses (MALAURIE et al., 2009). No Brasil, protocolos de conservação *in vitro* por crescimento lento têm sido estabelecidos para diversas espécies principalmente de propagação assexuada como mandioca, batatinha, batata-doce, cará, morango, aspargo, alho, videira (GOEDERT, 2005), cana-de-açúcar (LEMO et al., 2002), maracujazeiro (GONÇALVES et al., 2003; FARIA et al., 2006), batata (FORTES & PEREIRA, 2001) e abacaxi (CANTO et al., 2004). Lédo et al. (2007) testaram três concentrações de manitol que reduziram o desenvolvimento da parte aérea e radicular aos 160 dias de plântulas de coqueiro anão verde de Jiqui do Brasil. Resultados semelhantes foram obtidos por Damasco (2002) para cultivares de coqueiro anão amarelo da Malásia e coqueiro gigante. Apesar disso, existem ainda poucos trabalhos publicados sobre estratégias de conservação *in vitro* por crescimento mínimo.

No entanto, algumas desvantagens quanto ao crescimento lento precisam ser consideradas: a instabilidade genética de células não organizadas e calos; necessidades de frequentes subculturas; além de conservar o germoplasma vegetal por curtos períodos de tempo, dependendo da espécie da planta. Portanto, um sistema de conservação em longo prazo para conservação de estruturas organizadas com alta estabilidade genética e biológica deve ser desenvolvido para espécies propagadas vegetativamente e espécies com sementes recalcitrantes ou intermediárias, como por exemplo, o coco. Na atualidade, criopreservação é a única técnica capaz de atender estes pré-requisitos (SANTOS, 2000).

A criopreservação assegura a manutenção da viabilidade de estruturas organizadas, com alta estabilidade genética e integridade biológica e morfogênica, uma vez que, à temperatura do nitrogênio líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), o metabolismo celular é tão reduzido que os processos bioquímicos e a deterioração biológica são paralisados. Acrescenta-se a essas vantagens o baixo custo requerido para a conservação do material em condições criogênicas (SANTOS, 2000). Ressalta-se que qualquer parte da planta pode ser usada neste método de conservação, tais como protoplastos, suspensões celulares, calos, gemas apicais e laterais, meristemas, sementes, embriões somáticos e zigóticos e produtos biotecnológicos.

Diversas espécies de interesse econômico já foram criopreservadas com sucesso como o arroz (STANWOOD, 1994), cana-de-açúcar (PAULET et al., 1993), banana (PANIS et al., 1990), citrus (MARIN & DURAN-VILA, 1988). Para o coqueiro, embriões,

plúmulas e ápices caulinares têm sido utilizados resultados promissores (ASSY-BAH & ENGELMANN, 1992; MALAURIE & BORGES, 2001; N'NAN et al., 2008).

A conservação de recursos genéticos é tão importante, que em 2008 foi criado um banco internacional de sementes de Svalbard, localizado na Noruega, também chamado de “Arca de Noé”, para armazenar sementes de todas as espécies cultivadas pelo homem. Algumas espécies, como arroz, já são mantidas nessa fortaleza, que teve como motivação para a sua construção, mudanças climáticas globais e destruição de bancos de sementes, que vem acontecendo nos últimos anos, em mais de 40 países, dentre eles Iraque e Afeganistão. Desde sua inauguração, cem países já doaram cerca de 100 milhões de sementes inclusive o Brasil através da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA (SOURANDER, 2010). Por essas razões é visível a grande preocupação com a conservação de espécies de interesse econômico e, portanto, pesquisas científicas nessa área demandam de aprimoramento de técnicas.

2.6 Criopreservação de recursos genéticos de coqueiro

O coqueiro é uma cultura perene na qual a conservação de seus recursos genéticos é, sobretudo, baseada em coleções em campo, em virtude do tamanho da sua semente e por ser uma espécie recalcitrante dificultando o armazenamento (N'NAN et al., 2008).

A conservação de recursos genéticos de coco já vem sendo prioritária para o desenvolvimento de programas de conservação pela *Bioversity International* desde 1985 (ENGELMANN & ASSY-BAH, 1991). No entanto, para uma conservação segura de germoplasma de coco é impossível que não seja adotada uma técnica de conservação em longo prazo. Apenas a criopreservação em nitrogênio líquido (-196 °C), atualmente, oferece essa opção de conservação em longo prazo (ASSY-BAH & ENGELMANN, 1992).

A criopreservação é definida como a conservação ou preservação de material biológico em nitrogênio líquido a -196 °C, ou em sua fase de vapor a -150 °C (SANTOS & SALOMÃO, 2007). As primeiras observações sobre a resistência de material vegetal ao congelamento remontam ao final do século 19 e início do século 20, e foram feitas utilizando-se sementes (BROWN; ESCOMBE citados por PRITCHARD, 1995); esporos de fungos (BECQUEREL, 1910), polens (BECQUEREL, 1929), líquens (BECQUEREL, 1932). A partir da segunda metade do século 20, com o aprimoramento das técnicas de congelamento, sistemas vegetais mais complexos, como material vegetativo de espécies lenhosas de clima temperado, foram criopreservados (SAKAI, 1960).

Os primeiros estudos de criopreservação com coco foram apresentados por Bajaj (1984) usando embriões zigóticos. Assy- Bah e Engelmann (1992) utilizaram a técnica de vitrificação (glicose e glicerol) em embriões zigóticos maduros de coco do híbrido PB 121 (coqueiro anão amarelo da Malásia x coqueiro gigante da África), do coqueiro anão vermelho dos Camarões (AVC), coqueiro gigante da Índia (CGI) e coqueiro gigante de Renell (GRL), e obtiveram uma sobrevivência de 30 a 90%. Em outro trabalho usando embriões imaturos dos mesmos genótipos, Assy-Bah e Engelmann (1992), testaram a mesma técnica, usando glicerol e sorbitol como crioprotetores, obtendo 10 e 43% de sobrevivência, respectivamente.

Entretanto, ainda há a necessidade de pesquisas voltadas para a criopreservação do coqueiro, pois mesmo com resultados promissores ajustes e adequação de protocolos em função do genótipo e tipo do explante têm sido demandados. Além disso, não existem resultados publicados para os principais genótipos cultivados no Brasil como o coqueiro gigante e o anão verde de Jiqui do Brasil.

2.7 Vitrificação

As células vegetais apresentam uma alta quantidade de água, tanto intra como extracelular, e, portanto, são extremamente sensíveis à temperatura sub-zero, devido à formação de cristais de gelo. A cristalização intracelular provoca a ruptura do sistema de membranas celulares. Desidratações extremas, também podem causar esse tipo de dano. Técnicas de criopreservação têm sido desenvolvidas para minimizar ambos os tipos de danos.

Os primeiros procedimentos de criopreservação foram obtidos a partir da aplicação da criopreservação em células animais (GROUT & MORRIS, 1987), que se baseia na proteção química e congelamento lento, seguida pela rápida imersão em nitrogênio líquido. Essa técnica conhecida como método clássico, tem apresentado sucesso com calos e culturas de células, como exemplo, calos embriogênicos de cana e banana nos quais foram criopreservados com sucesso (GONZÁLES-BENITO et al., 2004).

Novas técnicas de criopreservação vêm sendo desenvolvidas com base na vitrificação. A vitrificação é definida como um processo físico no qual a água sofre uma transição da fase líquida para um estado sólido amorfo e metaestável (SANTOS & SALOMÃO, 2007). O estado vítreo tem vários efeitos benéficos para a célula desidratada, pois por estar em condições extremamente viscosa, restringe a difusão de substratos e produtos dentro das células, levando, portanto, a inatividade metabólica e dando estabilidade ao longo do tempo.

A desidratação do tecido vegetal pode ser obtida com diversas técnicas: desidratação do material em presença de sílica gel, soluções salinas, em fluxo de ar, bem como por tratamento com soluções concentradas de crioprotetores químicos (soluções de vitrificação) como dimetilsulfóxido (DMSO), etileno glicol, metanol, glicerol e propileno glicol (SANTOS & SALOMÃO, 2007). Entretanto, esses crioprotetores podem ser tóxicos ou causar estresse osmótico, levando à morte das células ou ainda modificando sua resposta morfogênética em cultura (KARTHA, 1985), além de acrescentar mais uma etapa no processo de desidratação.

Mais recentemente, açúcares passaram a ser utilizados como substâncias crioprotetoras por apresentarem citotoxicidade reduzida, mesmo quando se acumulam em grande quantidade no citoplasma (SANTOS & SALOMÃO, 2007). Apesar do modo de ação dos açúcares ainda não estar completamente elucidado, pode-se, no entanto, afirmar que como são usadas quantidades significativas de açúcares ou açúcares alcoóis nos tecidos vegetais, estes se acumulam de forma endógena aumentando a estabilidade das membranas sob condições de desidratação extrema (SAKAI & ENGELMANN, 2007). A vitrificação, em virtude do seu procedimento, pode ser considerada como uma técnica simples, podendo ser usada para estruturas complexas como embriões e ápices caulinares (WITHERS & ENGELMANN, 1998).

A melhor sobrevivência de eixos embrionários de *Citrus sinensis* ao congelamento em nitrogênio líquido foi alcançada por Santos e Sttushnoff (2002) após o pré-tratamento com 0,5 mol.L⁻¹ de sacarose por 12 horas. Assy-Bah e Engelmann (1992) obtiveram uma sobrevivência de 92,80% para a variedade PC 121, usando 1,75 mol.L⁻¹ de glicose + 15% de glicerol, como pré-tratamento, num período de 24 horas. E Halmagyl et al. (2010) testaram meio MS enriquecido com sacarose, manitol, sorbitol ou glicose e observaram uma maior sobrevivência em brotos de *Malus domestica* Borkh., cv. Romus4 e rootstock M106, usando sacarose como crioprotetor, comparado a outros açúcares.

Outro procedimento que também apresenta a vitrificação é o encapsulamento-desidratação, técnica esta, baseada na tecnologia de sementes artificiais que foi primeiramente desenvolvida por Fabre e Dereuddre (1990), e que consiste no encapsulamento dos explantes em gel de alginato de sódio, com subseqüente cultivo em soluções altamente concentrada de sacarose (vitrificação) e, posteriormente, imersos em nitrogênio líquido. Entretanto, para estruturas maiores (5 a 8 mm) como o embrião de

coco, por exemplo, torna-se inviável a aplicação desta técnica, devido a dificuldade em se formar as cápsulas.

Estes dois métodos, vitrificação e encapsulamento-desidratação, vêm sendo empregados com sucesso na criopreservação de embriões zigóticos e embriões somáticos de diversas espécies (ENGELMANN, 1997a), com o objetivo de desenvolver e ajustar protocolos de bancos de germoplasma no mundo.

2.8 Aspectos bioquímicos e fisiológicos durante o processo de criopreservação

A criopreservação é o método mais indicado para a conservação de recursos genéticos, pois o material vegetal é mantido em nitrogênio líquido, pelo fato de, sob estas condições, o metabolismo celular ser tão reduzido que os processos bioquímicos e a deterioração biológica são paralisados. Apesar dos benefícios da técnica, a utilização rotineira da criopreservação para a preservação da biodiversidade vegetal ainda é limitada (ZHU et al., 2006).

Antes mesmo de 1912, Maximov sugeriu que o rompimento da membrana celular era a principal causa de danos por congelamento. Posteriormente, Aroca et al. (2005) também afirmam esse tipo de lesão em plantas que sofreram esse estresse. Como em sua estrutura as membranas são formadas por uma dupla camada de fosfolípidios, que está num estado cristalino líquido à temperatura fisiológica, quando a água é removida essa camada passa para um estado de gel, sendo reversível após a reidratação, entretanto, essa mudança de comportamento lipídico pode ser prejudicial para a organização das membranas, uma vez que contribui para a perda de permeabilidade, compartimentação e atividade de enzimas ligadas a ela (CROWE et al., 1988). Zhu et al. (2006) sugerem a adição juntamente com o pré-tratamento altas concentrações de sacarose, esteróis ou ácidos graxos para o estabelecimento de novos protocolos, pois as variedades de banana (*Musa* sp.) em que as alterações de membrana foram mínimas, obtiveram maior sobrevivência após a criopreservação. Segundo Hao et al. (2009) a adição de açúcares proporciona um estado termodinamicamente estável, formado em virtude das ligações de hidrogênio com os fosfolípidios da membrana, favorecendo uma maior estabilidade a esta.

Alterações na integridade estrutural e na funcionalidade da membrana provocadas pelo estresse hídrico podem ser indicadas pelo vazamento de várias soluções citoplasmáticas (íons Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} e Na^+ ; açúcares e proteínas) que ocorrem após o processo de reidratação (SANTOS, 2000), promovendo a perda parcial de semi-permeabilidade da membrana. Conhecimentos sobre fisiologia, bioquímica e germinação são necessários porque podem avaliar o estado da membrana celular após estresse hídrico, informando assim, a viabilidade ou não do material vegetal.

A condutividade elétrica baseia-se na determinação da concentração de eletrólitos lixiviados na solução, a qual está diretamente relacionada com a integridade das membranas celulares, indicando o nível de vigor, por exemplo, de sementes. Pois durante o processo de maturação de sementes até o ponto de maturidade fisiológica, inúmeras transformações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e funcionais ocorrem, destacando-se o desenvolvimento das membranas, as quais diante de estresses são as primeiras a apresentarem sinais de deterioração (VIEIRA, 1994). Para Leopold (1980) o aumento da lixiviação de eletrólitos em sementes de soja injuriadas por baixa temperatura é consequência de falhas na reorganização das estruturas das membranas celulares, durante a fase de reidratação. Sendo assim, o vigor de semente pode ser avaliado pela condutividade elétrica, medida na solução de embebição de sementes, o que reflete a quantidade de lixiviados perdidos para o exterior da célula, logo, a integridade da membrana. Best (2010) sugere análises de Na^+ e/ou K^+ como primeiros testes para verificar a eficiência de crioprotetores após a criopreservação. Martins et al. (2009) consideraram testes de condutividade elétrica como promissores na avaliação da qualidade de sementes de açaizeiro. Souza et al. (2009) avaliaram como eficiente os

testes de condutividade elétrica por detectar diferenças na qualidade fisiológica de diversos lotes de mamona (*Ricinus communis* L.).

Outra metodologia que também pode ser aplicada para avaliar o vigor de uma semente é o teste de tetrazólio, apesar de algumas discussões sobre a confiabilidade de resultados, ainda é considerado uma alternativa promissora devido à rapidez na determinação de viabilidade em sementes. Este baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases, como a desidrogenase do ácido málico, que catalizam a reação de redução do sal de tetrazólio (2, 3, 5, trifenil cloreto de tetrazólio) nas células vivas, dando um composto (trifenilformazan) de coloração vermelha, resultado da reação de redução devido à atividade respiratória das mitocôndrias, indicando que o tecido está viável. Por outro lado, não ocorre a reação em tecido morto, não havendo assim, coloração vermelha, conservando-se sua cor natural (VIEIRA, 1994). Fernandes et al. (2005) distinguiram embriões de *Butia capitata* (Mart) Becc em viáveis de inviáveis, utilizando uma concentração de 0,5% de tetrazólio. Barros (2006) avaliou com rapidez a viabilidade de sementes de mangaba através do teste de tetrazólio.

Não existem trabalhos na literatura que mencionem a avaliação da eficiência dos crioprotetores na viabilidade de espécies criopreservadas a partir de testes de condutividade elétrica, lixiviação de potássio e tetrazólio. Portanto, experimentos para adaptar como também validar a aplicação desses testes na área de criopreservação, tornam-se imprescindíveis e necessários.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e excisão dos embriões zigóticos maduros de coco AveJBr

Foram utilizados embriões zigóticos de frutos com 11 meses de maturação provenientes de um plantio de Coqueiro Anão Verde de Jiqui do Brasil (AveJBr), da Fazenda H. Dantas, Lote 24, Platô de Neópolis, Sergipe. O plantio, com seis anos de idade, foi realizado em argisolo amarelo, de fertilidade média a baixa, com sistema de irrigação de microaspersão localizada 3,7 mm/dia.

Cilindros de endosperma com embriões zigóticos extraídos de frutos maduros foram submetidos à pré-asepsia com imersão em hipoclorito de sódio comercial 2-2,5% e lavados em água potável por três vezes, no local da coleta. Em seguida foram acondicionados em recipientes estéreis e encaminhados para o Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, Sergipe. Em condições assépticas, os embriões foram excisados dos cilindros de endosperma, imersos em álcool etílico a 70%, por dois minutos, em solução de hipoclorito de sódio comercial (1% v/v) por três minutos, sob agitação e, posteriormente, foram lavados três vezes em água destilada estéril, e colocados em placas de Petri estéreis.

3.2 Desidratação dos embriões zigóticos de coco AveJBr

3.2.1 Efeito do tempo e de crioprotetores na desidratação de embriões zigóticos de coqueiro AveJBr em câmara de fluxo laminar e em sílica gel

Foram avaliados os efeitos de diferentes tempos de desidratação, tratamentos de crioprotetores e tipos de secagem na umidade dos embriões (Figura 1). Os embriões assépticos oriundos do item 1, foram colocados em placas de Petri abertas, contendo papel de filtro de porosidade 14 μm , sem meio de cultura e desidratados por quatro horas na corrente de ar da câmara de fluxo laminar a temperatura ambiente (Tratamento 1) e por quatro horas sob sílica gel a temperatura ambiente (Tratamento 2).

Os embriões, parcialmente desidratados, foram inoculados em meio de cultura líquido Y3 (Eeuwens, 1976) com quatro diferentes pré-tratamentos de crioprotetores: T1- 1,75 mol.L⁻¹ de sacarose + 15% de glicerol ; T2- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose + 15% de glicerol (Assy-Bah & Engelmann, 1992); T3- 1,75 mol.L⁻¹ de sacarose e T4- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose. As culturas foram mantidas sob agitação em mesa orbital sob rotação de 100 rpm por 12, 16 e 20 horas. Após esse período, os embriões foram colocados em placa de Petri contendo papel de filtro, para a retirada do excesso de meio de cultura e, em seguida, foi determinada a massa fresca (MF) em balança digital. Em seguida, os embriões foram colocados em recipientes de metal e mantidos em estufa a 105 °C por 18 horas para a determinação da massa seca (MS).

A umidade dos embriões foi determinada utilizando a fórmula $TU = (MF-MS)/MF \times 100$ (AOAC, 1990).

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com quatro pré-tratamentos combinados com três tempos de desidratação perfazendo um total de 12 tratamentos com três repetições, sendo cada parcela com 10 embriões (triplicata de 10 embriões/tratamento), totalizando 360 embriões.

3.2.2 Efeito do tempo e de crioprotetores na desidratação de embriões zigóticos de coco AveJBr

Devido às altas umidades apresentadas pelos embriões nos experimentos do item 3.2.1, o fluxograma testado inicialmente (Figura 1) foi adaptado (Figura 2) sendo denominado de metodologia CPATC.

Foram avaliados os efeitos de diferentes tempos de desidratação e tratamentos de crioprotetores conforme metodologia CPATC da umidade dos embriões (Figura 2).

Os embriões assépticos foram inoculados em meio de cultura líquido Y3 (Eeuwens, 1976) com quatro diferentes pré-tratamentos de crioprotetores: T1-1,75 mol.L⁻¹ de sacarose + 15% de glicerol ; T2- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose + 15% de glicerol (Assy-Bah & Engelmann, 1992); T3- 1,75 mol.L⁻¹ de sacarose e T4- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose. As culturas foram mantidas sob agitação em mesa orbital sob rotação de 100 rpm por 12, 16 e 20 horas.

Após esse período, os embriões foram colocados em placa de Petri contendo papel de filtro, para a retirada do excesso de meio de cultura e, em seguida, foi determinada a massa fresca (MF) em balança digital. Em seguida, os embriões foram colocados em recipientes de metal e mantidos em estufa a 105 °C por 18 horas para a determinação da massa seca (MS).

A umidade dos embriões foi determinada utilizando a fórmula $TU = (MF-MS)/MF \times 100$ (AOAC, 1990).

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com quatro pré-tratamentos combinados com três tempos de desidratação perfazendo um total de 12 tratamentos com três repetições, sendo cada parcela com 10 embriões (triplicata de 10 embriões/tratamento), totalizando 360 embriões.

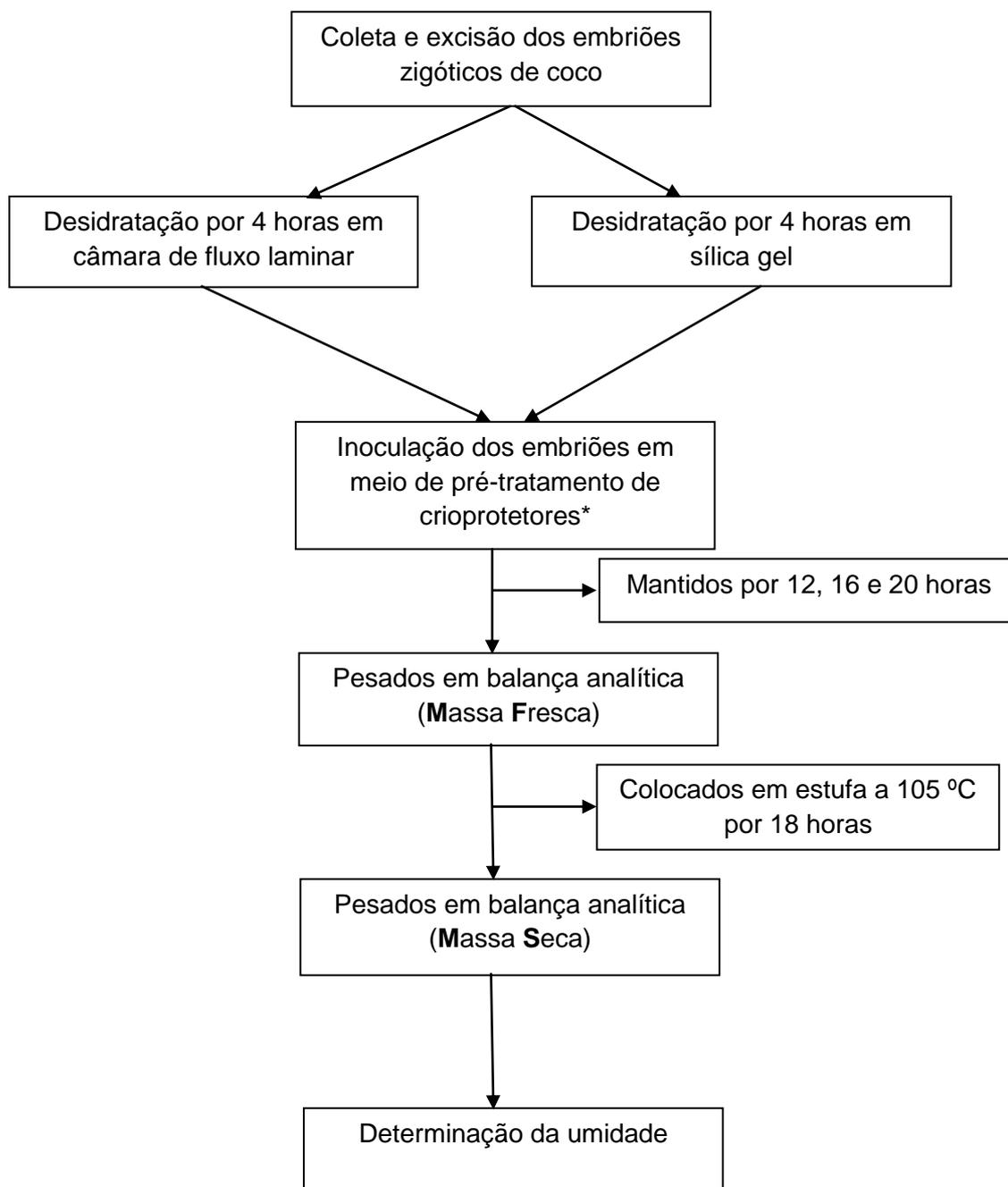


Figura 1. Fluxograma da avaliação do efeito do tempo de desidratação de embriões zigóticos de coco AveJBr em câmara de fluxo laminar e sílica gel.

* T1-1,75 mol.L⁻¹ de sacarose + 15% de glicerol;

T2- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose + 15% de glicerol (Assy-Bah & Engelmann, 1992);

T3- 1,75 mol.L⁻¹ de sacarose;

T4- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose.

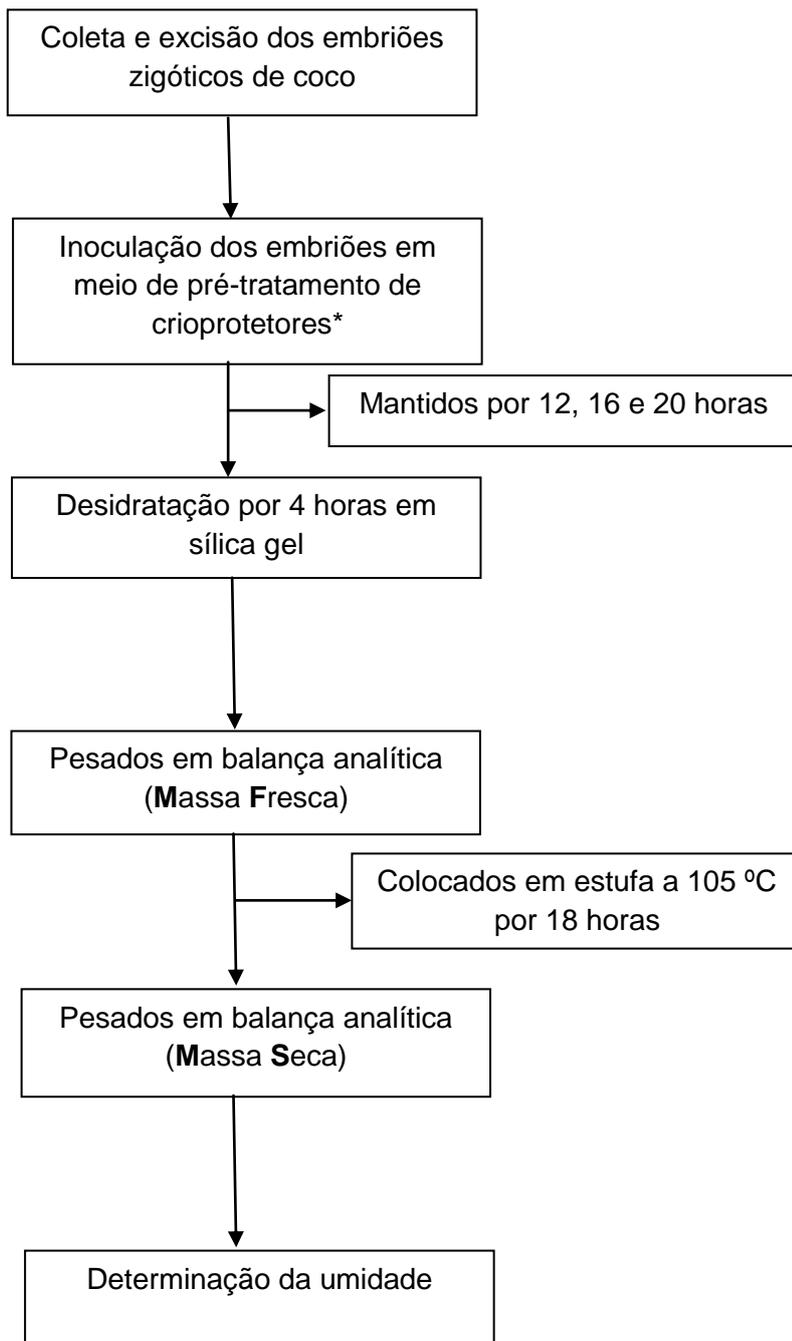


Figura 2. Fluxograma da avaliação do efeito do tempo de desidratação de embriões zigóticos de coco AveJBr usando metodologia CPATC.

* T1-1,75 mol.L⁻¹ de sacarose + 15% de glicerol;

T2- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose + 15% de glicerol (Assy-Bah & Engelmann, 1992);

T3- 1,75 mol.L⁻¹ de sacarose;

T4- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose.

3.2.3 Recuperação de embriões criopreservados

Após a seleção do método de desidratação CPATC (Figura 2), embriões zigóticos de coqueiro AveJBr foram submetidos a 4 tratamentos com crioprotetores (T1-1,75 mol.L⁻¹ de sacarose + 15% de glicerol ; T2- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose + 15% de glicerol; T3- 1,75 mol.L⁻¹ de sacarose e T4- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose) combinados com 3 tempos de incubação (12, 16 e 20 horas), com 20 embriões/tratamento, totalizando 480 embriões. Em seguida, metade dos embriões foram acondicionados em criotubos com 2 mL de capacidade (10 embriões/criotubo) e criopreservados em tambor de nitrogênio líquido a -196 °C por 48 horas (NL+), e outra metade dos embriões foi inoculada em meio de Y3 líquido (NL -) e mantidos na ausência de luz. Após 48 horas, os embriões criopreservados foram submetidos à etapa de recuperação que consistiu no descongelamento rápido em banho-maria a 40 °C por cinco minutos e inoculação imediata em frascos com 25 mL de meio de regeneração Y3 líquido suplementado com 60 g.L⁻¹ de sacarose, conforme Lédo et al. (2007) e mantidos na ausência de luz na sala de crescimento. Após 30, 60 e 90 dias foram avaliados a porcentagem de germinação dos embriões e análise descritiva dos embriões.

3.3 Testes bioquímicos e fisiológicos

Testes de condutividade elétrica, lixiviação de potássio e tetrazólio foram realizados para avaliar a viabilidade dos embriões zigóticos após a criopreservação.

3.3.1 Teste de condutividade elétrica

3.3.1.1 Determinação do tempo de incubação e tamanho da amostra (Controle)

Antes da aplicação dos testes condutividade elétrica nos embriões criopreservados foram determinadas as condutâncias elétricas antes da imersão em nitrogênio líquido dos embriões recém excisados dos frutos, para a seleção do melhor tempo de incubação e tamanho da amostra de embriões necessários para a aplicação do teste. Para tanto, foram testados cinco tempos de incubação: 4, 8, 12, 24 e 36 horas, em amostras com 10, 20 e 30 embriões zigóticos maduros de coco com três repetições para cada tratamento, totalizando 180 embriões.

Os embriões foram colocados para embeber em copos de plástico (capacidade de 200 mL) contendo 80 mL de água deionizada, mantidas em B.O.D. a temperatura constante de 20 °C. Após cada período, a condutividade elétrica foi medida em condutímetro OARTON, modelo CON510, e os resultados expressos em μS (VIEIRA, 1994). Também foram determinadas as massas frescas das amostras a cada tempo em balança analítica, sempre após a medição de condutividade.

Embriões de cada tratamento foram inoculados em meio de cultura Y3 para germinação (testemunha) e mantidos em sala de crescimento na ausência de luz a temperatura de 22 °C.

3.3.1.2 Condutividade elétrica em embriões criopreservados submetidos a pré-tratamentos com crioprotetores

A condutividade elétrica foi medida em embriões zigóticos de coco criopreservados submetidos anteriormente a quatro pré-tratamentos com crioprotetores (T1-1,75 mol.L⁻¹ de sacarose + 15% de glicerol ; T2- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose + 15% de glicerol (ASSY-BAH & ENGELMANN, 1992); T3- 1,75 mol.L⁻¹ de sacarose e T4- 1,75

mol.L⁻¹ de glicose) combinados com três tempos de incubação (12, 16 e 20 horas), totalizando 12 tratamentos e 120 embriões.

Após a criopreservação em tambor de nitrogênio a - 196 °C, os embriões acondicionados em criotubos foram imediatamente descongelados em banho-maria a 40 °C por cinco minutos. Em seguida a condutividade elétrica foi medida conforme descrito anteriormente em amostras de cada tratamento com 10 embriões. Os resultados expressos em μS .

Embriões de cada tratamento foram inoculados em meio de cultura Y3 para germinação (testemunha) e mantidos em sala de crescimento na ausência de luz a temperatura de 22 °C.

3.3.2 Teste de lixiviação de potássio

3.3.2.1 Determinação do tamanho da amostra (Controle)

Para determinação do melhor tamanho da amostra de embriões zigóticos de coqueiro para a quantificação do potássio lixiviado pela membrana foram utilizadas em triplicata amostras de 10, 20 e 30 embriões zigóticos maduros de coco, totalizando 180 embriões. Estes foram colocados para embeber em copos de plástico (capacidade de 200 mL) contendo 80 mL de água deionizada, mantidas em B.O.D. a temperatura constante de 20 °C (VIEIRA, 1994). Após 36 horas de incubação, foram retiradas alíquotas de 2,5 mL de cada exsudado e diluídas em 25 mL de água deionizada para determinação do potássio lixiviado mediante leitura em Espectrômetro de Absorção Atômica 55B, modelo SpectrAA, conforme metodologia adaptada de Souza (2009). Os resultados obtidos foram expressos em ppm de potássio.

3.3.2.2 Lixiviação de potássio em embriões criopreservados submetidos a pré-tratamentos com crioprotetores

A lixiviação de potássio foi medida no exsudado de embriões zigóticos de coco criopreservados submetidos anteriormente a quatro pré-tratamentos com crioprotetores (T1-1,75 mol.L⁻¹ de sacarose + 15% de glicerol ; T2- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose + 15% de glicerol (ASSY-BAH & ENGELMANN, 1992); T3- 1,75 mol.L⁻¹ de sacarose e T4- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose) combinados com três tempos de incubação (12, 16 e 20 horas).

Após a criopreservação, os embriões acondicionados em criotubos foram imediatamente descongelados em banho-maria a 40 °C por cinco minutos. Em seguida, a lixiviação de potássio foi medida conforme descrito anteriormente em amostras de cada tratamento com 10 embriões. Os resultados obtidos foram expressos em ppm de potássio.

3.3.3. Testes com tetrazólio

3.3.3.1 Determinação da concentração de tetrazólio (Controle)

Para a determinação da concentração de tetrazólio para avaliação da viabilidade dos embriões zigóticos de coco, testaram-se quatro concentrações de solução de tetrazólio (1; 0,75; 0,5 e 0,25%) com 10 repetições, totalizando 40 embriões zigóticos. As soluções foram preparadas de acordo com as Regras para Análise de Sementes (1992). Os embriões foram imersos nas quatro concentrações e mantidos na ausência de luz em B.O.D. a 40 °C por duas horas. Posteriormente, foram lavados em água corrente, e deixados sob papel de filtro em placa de Petri, para retirada do excesso de água (VIEIRA, 1994).

A viabilidade dos embriões foi avaliada por meio da porcentagem da área do embrião com coloração vermelha, resultado da reação de redução do sal de tetrazólio: 0% - embrião sem coloração (ausência de reação); 25% da coloração da zona meristemática do embrião; 50% de coloração na zona meristemática do embrião; 75% da zona meristemática completamente colorida e parte da zona basal do embrião; 100% do embrião com coloração. As porcentagens de coloração podem ser observadas na Figura 3.

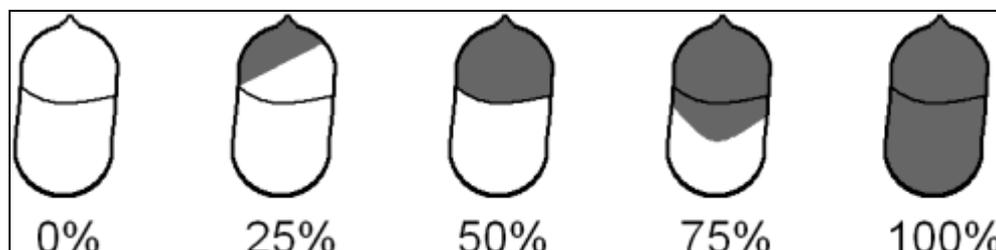


Figura 3. Porcentagens da área do embrião com coloração vermelha utilizadas para avaliar a viabilidade de embriões zigóticos de coco AveJBr.

Embriões de cada tratamento foram inoculados em meio de cultura Y3 para germinação (testemunha) e mantidos em sala de crescimento na ausência de luz a temperatura de 22 °C.

3.3.3.2 Teste de tetrazólio em embriões criopreservados submetidos a pré-tratamentos com crioprotetores

Para a determinação da viabilidade de embriões zigóticos de coco criopreservados, submetidos anteriormente a quatro tratamentos crioprotetores combinados com 3 tempos de imersão, utilizou-se a concentração de 0,25% de solução de tetrazólio, preparada de acordo com as Regras para Análise de Sementes (1992), em 12 tratamentos de embriões criopreservados. Após a criopreservação, os embriões acondicionados em criotubos foram imediatamente descongelados em banho-maria a 40 °C por cinco minutos. Em seguida, amostras de 10 embriões de cada tratamento de crioproteção foram imersas em solução de tetrazólio (0,25%) e mantidas na ausência de luz em B.O.D. a 40 °C por duas horas. Posteriormente, lavados em água corrente, e deixados sob papel de filtro numa placa de Petri, para retirada do excesso de água.

Para cada tratamento, avaliou-se a porcentagem de coloração apresentada pelos embriões, conforme descrito anteriormente (Figura 3).

Embriões de cada tratamento foram inoculados em meio de cultura Y3 para germinação (testemunha) e mantidos em sala de crescimento na ausência de luz a temperatura de 22 °C.

3.4. Análises estatísticas

Para todas as variáveis analisadas foram calculadas as estatísticas descritivas médias e erro padrão da média pelo programa GraphPad Prism 3.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desidratação dos embriões zigóticos de coco AveJBr

4.1.1 Efeito do tempo e de crioprotetores na desidratação de embriões zigóticos de Coco AveJBr em câmara de fluxo laminar, sílica gel e metodologia CPATC

Os resultados mostraram que a desidratação de embriões por quatro horas em câmara de fluxo laminar e posterior tratamento com $1,75 \text{ mol.L}^{-1}$ de sacarose + 15% glicerol (T1), promoveu a menor umidade, independente do tempo de imersão (Tabela 1, Figura 4). Este resultado também foi observado para a desidratação em sílica gel como também para a metodologia CPATC (Tabela 1, Figuras 5 e 6).

O T1 pode ter favorecido uma maior desidratação dos embriões zigóticos de coco devido a mistura de solução da sacarose e do glicerol, pois como estes são dissacarídeo de glicose + frutose e poliálcool, respectivamente, apresentam em sua estrutura diversos grupamentos hidroxila, comparados aos demais tratamentos, sendo que estes grupos têm a capacidade de formar ligações de hidrogênio com as “cabeças” polares dos fosfolipídios da membrana e, assim, substituir as moléculas de água ligadas aos fosfolipídios no estado hidratado (ZHU et al., 2006). Segundo Dumet et al. (1993) os açúcares podem agir como agentes osmóticos externos, removendo o excesso de água intracelular através de um gradiente osmótico. Hao et al. (2009) obteve resultados satisfatórios quando adicionou ao meio de cultivo sacarose ou polietilenoglicol (PEG) 1500-6000 na estabilidade dos lisossomos sugerindo que a capacidade de formar pontes de hidrogênio executa um papel importante na proteção osmótica do soluto para o lisossomo. Os autores relatam ainda que, principalmente em misturas de soluções que contenham sacarose e poliálcool, as ligações de hidrogênio entre soluto e água são tão fortes e numerosas que se tornam termodinamicamente estáveis, ou seja, favorecem uma maior estabilidade na membrana celular.

Os embriões submetidos a metodologia CPATC em 16hT1 apresentaram $23,48 \pm 1,94\%$ de umidade. Essa baixa umidade, comparada aos demais métodos, ocorreu, provavelmente, porque os embriões foram primeiramente imersos no meio crioprotetor o que proporcionou uma pré-desidratação e, em seguida, foram desidratados em sílica gel. A sílica gel adsorveu mais água comparada a secagem em câmara de fluxo laminar.

A metodologia CPATC apresentou maior umidade nos embriões, provavelmente, porque a secagem inicial foi em câmara de fluxo laminar e/ou sílica gel com posterior tratamento crioprotetor, o que pode ter comprometido a desidratação ideal dos embriões, pois os mesmos podem ter absorvido água da solução crioprotetora. Um baixo teor de umidade no explante é importante, uma vez que quanto menor a quantidade de água no tecido vegetal maior será a sobrevivência deste após a imersão em nitrogênio líquido devido à redução da possibilidade de formação de cristais de gelo.

Tabela 1. Efeito do tempo de desidratação de embriões zigóticos de coco AveJBr em câmara de fluxo laminar, sílica gel e na metodologia CPATC em diferentes pré-tratamentos de crioprotetores. Aracaju, Embrapa, 2010.

Tempo (horas)	Umidade (%)			
	T1	T2	T3	T4
Câmara de fluxo laminar				
12	34,17 ± 0,51	49,30 ± 0,51	45,08 ± 0,60	61,68 ± 1,79
16	35,73 ± 0,31	51,25 ± 0,13	45,01 ± 0,24	62,41 ± 0,46
20	35,58 ± 0,08	52,51 ± 0,63	46,10 ± 0,10	61,06 ± 0,17
Sílica Gel				
12	42,68 ± 4,28	50,63 ± 0,46	48,98 ± 0,45	61,83 ± 0,25
16	36,53 ± 0,43	50,91 ± 1,18	45,72 ± 0,38	62,78 ± 0,03
20	35,35 ± 0,04	50,54 ± 0,20	44,82 ± 0,20	62,00 ± 0,17
Metodologia CPATC				
12	26,63 ± 0,74	34,22 ± 0,88	30,70 ± 4,39	45,45 ± 0,48
16	23,48 ± 1,94	31,07 ± 0,64	28,00 ± 0,47	43,17 ± 1,78
20	31,87 ± 3,96	42,89 ± 0,13	44,16 ± 11,57	41,38 ± 1,67

Valores representam a média de 3 repetições ± erro padrão da média.

T1-1,75 mol.L⁻¹ de sacarose + 15% de glicerol ; T2- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose + 15% de glicerol; T3- 1,75 mol.L⁻¹ de sacarose e T4- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose

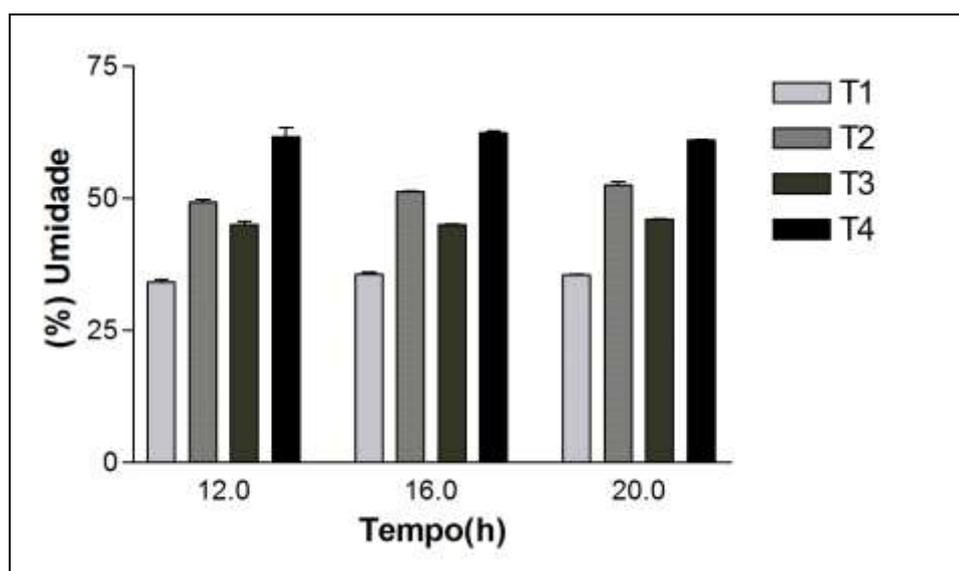


Figura 4. Efeito dos crioprotetores no meio de pré-tratamento em câmara de fluxo laminar na desidratação dos embriões zigóticos de coco de AveJBr. Cada coluna representa a média de três repetições ± erro padrão da média ($P < 0,0001$)

T1-1,75 mol.L⁻¹ de sacarose + 15% de glicerol ; T2- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose + 15% de glicerol; T3- 1,75 mol.L⁻¹ de sacarose e T4- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose

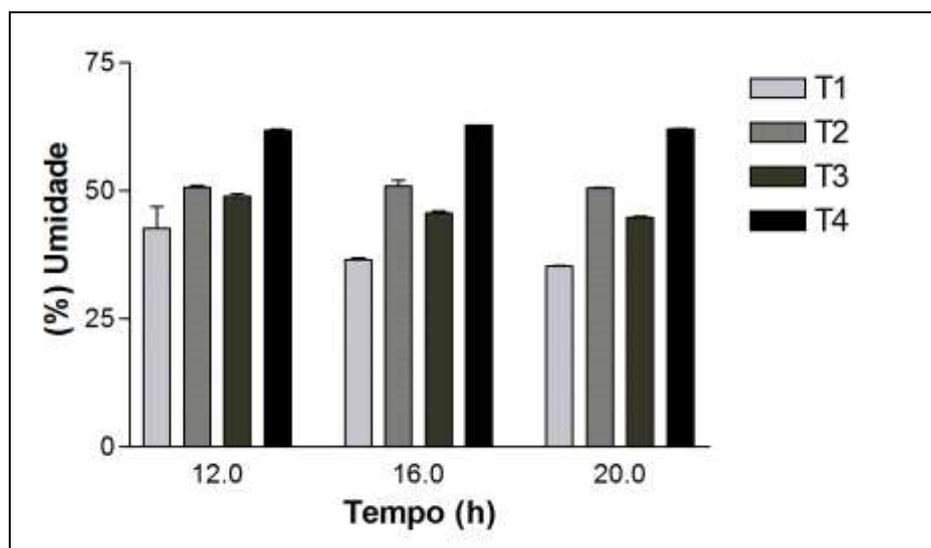


Figura 5. Efeito dos crioprotetores no meio de pré-tratamento em sílica gel na desidratação dos embriões zigóticos de coco AveJBr. Cada coluna representa a média de três repetições \pm erro padrão da média ($P < 0,0001$)

T1-1,75 mol.L⁻¹ de sacarose + 15% de glicerol ; T2- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose + 15% de glicerol; T3- 1,75 mol.L⁻¹ de sacarose e T4- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose

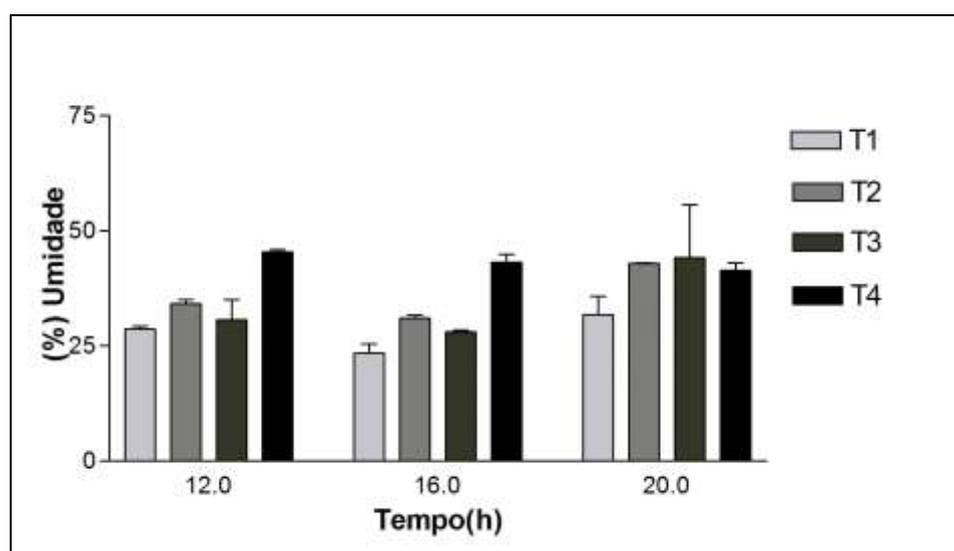


Figura 6. Efeito dos crioprotetores no meio de pré-tratamento adaptado na desidratação dos embriões zigóticos de coco AVEJBr. Cada coluna representa a média de três repetições \pm erro padrão da média ($P < 0,05$).

T1-1,75 mol.L⁻¹ de sacarose + 15% de glicerol ; T2- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose + 15% de glicerol; T3- 1,75 mol.L⁻¹ de sacarose e T4- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose

Cristais de gelo no meio intracelular causam ruptura do sistema de membranas celulares, resultando em perda de permeabilidade e da compartimentação celular, em consequência disso, as células entram em colapso e morrem (SANTOS, 2001). Entretanto, Assy-Bah e Engelmann (1992) obtiveram, em média, durante as 15 primeiras horas de pré-tratamento, um decréscimo da umidade de $79,3 \pm 6,7\%$ para $5,7 \pm 4,2\%$ no período de tempo de 0 a 24 horas. Os embriões com maiores dimensões (variedades RT e IT7) desidrataram mais lentamente que os menores (variedade CRD). Estes resultados

discordam dos obtidos no presente trabalho que obtiveram, em média, maior umidade para o coqueiro AveJBr. Talvez a umidade dos embriões possa variar em função do genótipo.

Em relação ao tempo de imersão dos embriões no meio crioprotetor o período de 12 horas foi o que proporcionou menor umidade ($34,17 \pm 0,513\%$) em câmara de fluxo laminar. Para a sílica gel, a menor umidade foi obtida com a imersão por 20 horas ($35,35 \pm 0,037\%$). Na metodologia CPATC, foram observadas as menores umidades dos embriões imersos por 16 horas ($23,48 \pm 1,94\%$). Entretanto, o período de imersão em 20 horas na metodologia CPATC, provocou um aumento da umidade, contrariando a hipótese de que quanto maior o tempo maior a desidratação. Assy-Bah e Engelmann (1992) obtiveram umidades que decresciam com o decorrer do tempo (zero a 24 horas) com quatro variedades de embriões maduros de coco. Provavelmente, no período de 20 horas, houve uma saturação das ligações de hidrogênio que se formaram durante o processo de desidratação, não ocorrendo mais a substituição das moléculas de água ligadas aos fosfolipídios no estado hidratado.

Em estudos conduzidos por Engelmann (1992) foi observado que o teor de água inicial dos embriões de coco é geralmente entre 50 e 60%, e a sobrevivência máxima observada foi de 10 a 16%, em apenas 2 a 4 horas de desidratação. Por essa razão a obtenção de metodologias que ofereçam uma menor umidade nos explantes é de grande importância para essa espécie.

4.2 Testes bioquímicos e fisiológicos

4.2.1 Teste de condutividade elétrica

4.2.1.1 Controle

Nos testes de condutividade elétrica realizados para o controle, houve um aumento praticamente proporcional entre as três amostras de embriões de coco (Tabela 2, Figura 7), sendo observado o aumento da condutância com o aumento do tamanho da amostra.

Tabela 2. Massa fresca dos embriões não criopreservados de coco AveJBr em função do tempo de incubação e do tamanho da amostra. Aracaju, Embrapa, 2010.

TEMPO (h) DE INCUBAÇÃO	MASSA (g)		
	10 embriões	20 embriões	30 embriões
0	$1,30 \pm 0,04$	$2,55 \pm 0,01$	$3,93 \pm 0,13$
4	$1,43 \pm 0,04$	$2,79 \pm 0,01$	$4,34 \pm 0,14$
8	$1,46 \pm 0,05$	$2,85 \pm 0,01$	$4,41 \pm 0,12$
12	$1,50 \pm 0,05$	$2,93 \pm 0,02$	$4,55 \pm 0,12$
24	$1,57 \pm 0,05$	$2,99 \pm 0,04$	$4,71 \pm 0,13$
36	$1,61 \pm 0,05$	$3,07 \pm 0,05$	$4,84 \pm 0,13$

Valores representam a média de 3 repetições \pm erro padrão da média.

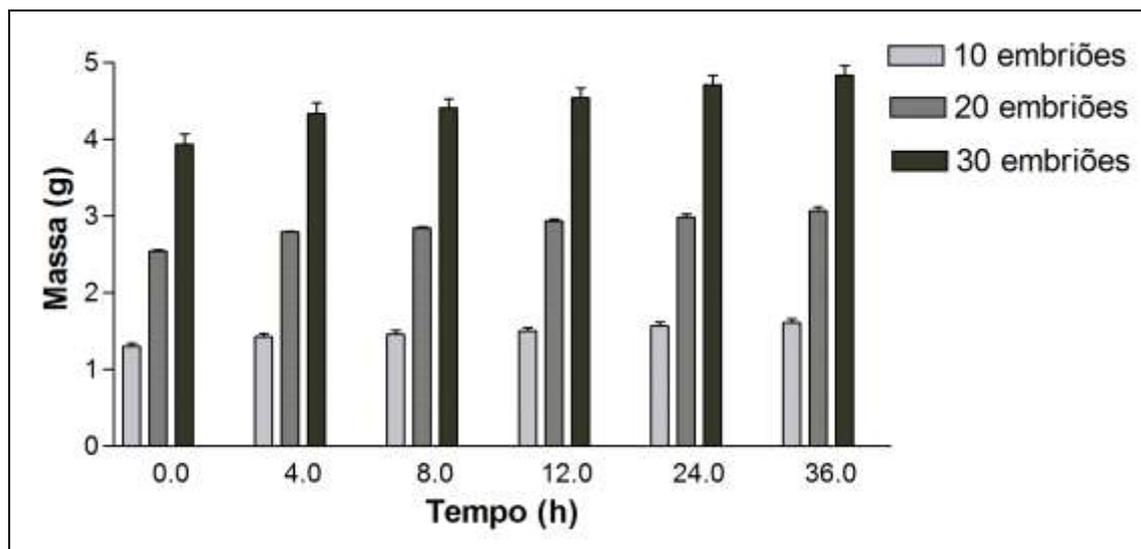


Figura 7. Efeito do tempo de incubação e do tamanho da amostra na massa fresca de embriões zigóticos de coco AveJBr. Cada coluna representa a média de três repetições \pm erro padrão da média ($P < 0,0001$).

(T1-1,75 mol.L⁻¹ de sacarose + 15% de glicerol ; T2- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose + 15% de glicerol; T3- 1,75 mol.L⁻¹ de sacarose e T4- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose)

O tamanho da amostra de 10 embriões foi selecionado para os testes posteriores, por apresentar sensibilidade suficiente para a leitura do condutímetro. Embora diversos trabalhos com outras espécies utilizem amostras com um número maior de sementes para avaliação da viabilidade por meio da condutividade, é importante destacar que para o coqueiro no presente trabalho o teste foi aplicado a embriões zigóticos excisados da semente. Martins et al. (2009) usaram amostras com 25 sementes de açaí (*Euterpe spp.*) por repetição para determinação da condutividade elétrica.

Observou-se que as massas iniciais dos embriões em todas as amostras (10, 20 e 30 embriões de coco), aumentaram gradativamente com o tempo de incubação, não ocorrendo estabilidade até as 36 horas de monitoramento. Entretanto, Vanzolini e Nakagawa (1999) relatam que no início do processo de incubação, ocorre uma rápida e intensa liberação de eletrólitos até atingir um ponto de equilíbrio, quando as membranas celulares se reorganizam. Provavelmente o tempo máximo de 36 horas não foi suficiente para o alcance desse equilíbrio e/ou devido ao tamanho do embrião de coco.

Como não foi observada uma estabilidade na absorção de água, estudos complementares deverão ser conduzidos para avaliação da integridade de membranas de embriões criopreservados de coqueiro com a definição do melhor tempo de incubação para testes de condutividade.

Houve 100% de germinação dos embriões de coco que foram inoculados em meio líquido de Y3 (controle) antes do início dos testes de condutividade elétrica, mostrando dessa forma o seu alto vigor.

Tabela 3. Condutividade elétrica em três amostras de embriões de coco AveJBr não criopreservados. Aracaju, Embrapa, 2010.

TEMPO (h) DE INCUBAÇÃO	CONDUTIVIDADE ELÉTRICA (μS)		
	10 embriões	20 embriões	30 embriões
0	3,83 \pm 0,00	3,83 \pm 0,00	3,83 \pm 0,00
4	56,13 \pm 0,43	92,20 \pm 2,77	143,70 \pm 19,78
8	86,93 \pm 0,04	163,57 \pm 4,64	250,33 \pm 20,54
12	106,23 \pm 2,19	205,53 \pm 6,69	309,33 \pm 22,98
24	147,00 \pm 5,54	290,00 \pm 3,05	427,33 \pm 35,71
36	169,27 \pm 11,20	337,33 \pm 9,84	497,33 \pm 46,62

Valores representam a média de três repetições \pm erro padrão da média ($P < 0,0001$).

(T1-1,75 mol.L⁻¹ de sacarose + 15% de glicerol ; T2- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose + 15% de glicerol; T3- 1,75 mol.L⁻¹ de sacarose e T4- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose)

Com relação ao tempo de incubação, foi observada a menor condutividade no período de quatro horas (56,133 \pm 2,544 μS) para a amostra de 10 embriões que apresentou aumento até as 36 horas quando a leitura foi de 169,267 \pm 11,202 μS . Os valores de condutividade elétrica para as amostras de 20 e 30 embriões foram praticamente proporcionais aos obtidos na amostra de 10 embriões (Tabela 3, Figura 8).

O período de quatro a oito horas de incubação pode ser considerado promissor para análises de condutividade em embriões zigóticos de coqueiro por apresentar menores valores numéricos. Vieira (1994) relata que quanto menor a condutividade menor é a possibilidade de dano na membrana celular, e, em consequência, uma diminuição da lixiviação de eletrólitos. Souza et al. (2009) concluíram que a partir de seis horas de incubação já era possível separar lotes de duas cultivares de mamona em diferentes níveis de vigor, com redução significativa no período de incubação das sementes, em relação ao período de 24 horas, que é adotado como padrão para uma grande maioria de espécies.

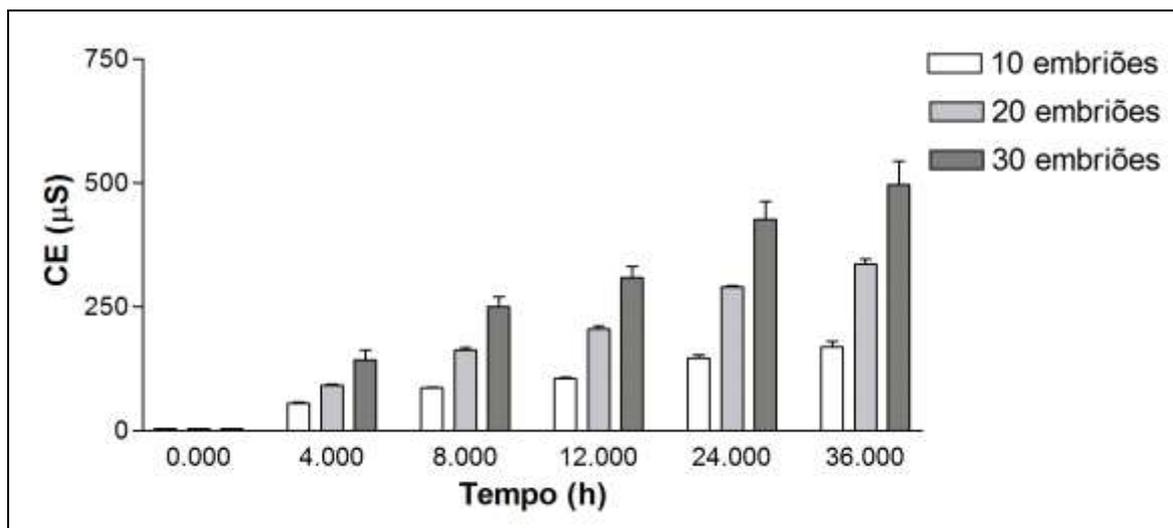


Figura 8. Condutividade elétrica em três amostras de embriões zigóticos de coco AveJBr não criopreservados. Cada coluna representa a média de três repetições \pm erro padrão da média ($P < 0,0001$).

(T1-1,75 mol.L⁻¹ de sacarose + 15% de glicerol ; T2- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose + 15% de glicerol; T3- 1,75 mol.L⁻¹ de sacarose e T4- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose)

Para avaliação da condutividade em embriões criopreservados foi considerado o tempo de incubação de 24 horas conforme metodologia de Vieira (1994) e tamanho da amostra de 10 embriões. Conforme Figura 9 foi observada nos tratamentos 12hT1 e 16hT1 uma condutividade elétrica de 270 e 265 μ S, respectivamente, considerada baixa em relação aos outros tratamentos.

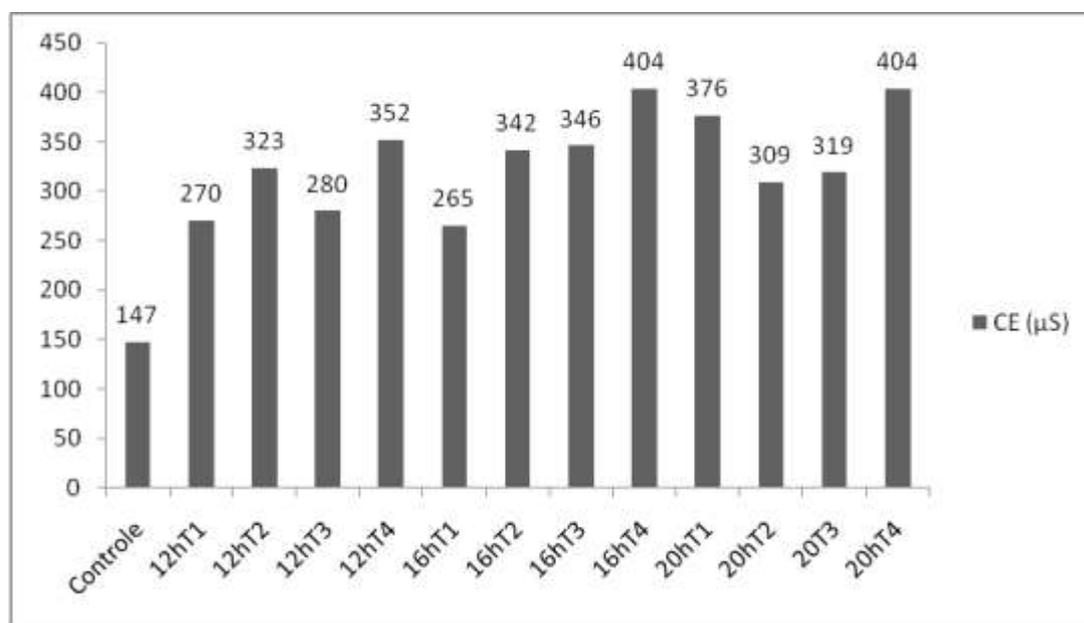


Figura 9. Condutividade elétrica dos embriões de coco AveJBr criopreservados após 24 horas de incubação em função dos tratamentos de crioproteção.

(T1-1,75 mol.L⁻¹ de sacarose + 15% de glicerol ; T2- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose + 15% de glicerol; T3- 1,75 mol.L⁻¹ de sacarose e T4- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose)

Esses resultados complementam os testes de viabilidade com tetrazólio, uma vez que esses mesmos tratamentos foram os que apresentaram a maior viabilidade ($80,00 \pm 5,00\%$).

Não existe referencial teórico de estudos com condutividade elétrica em embriões de zigóticos de coqueiro AveJBr criopreservados, não sendo possível avaliar a qualidade fisiológica desses embriões, tendo em vista que até os 90 dias não houve germinação dos mesmos na etapa de recuperação. Martins et al. (2009) avaliaram apenas a qualidade relativa entre lotes ou amostras testadas de açaí, pois um problema comum aos testes de qualidade de sementes de espécies nativas, bem como de espécies cultivadas, é a inexistência de valores referenciais. Entretanto, menores valores de condutividade elétrica decorrem de uma menor lixiviação de solutos, e, conseqüentemente, uma menor desestruturação das membranas celulares, correspondendo a manutenção do vigor (VIEIRA, 1994). Souza et al. (2009) verificaram nos testes de condutividade para mamona (cultivar IAC 80) uma intensa lixiviação de eletrólitos no início do teste, sendo mais evidente no lote classificado como de qualidade inferior.

A lixiviação de íons K^+ foi avaliada após a medição da condutividade elétrica da solução, ou seja, após 24 horas de incubação, e foi possível observar menor lixiviação dos embriões nos tratamentos 12hT1 e 16hT1 (Figura 10).

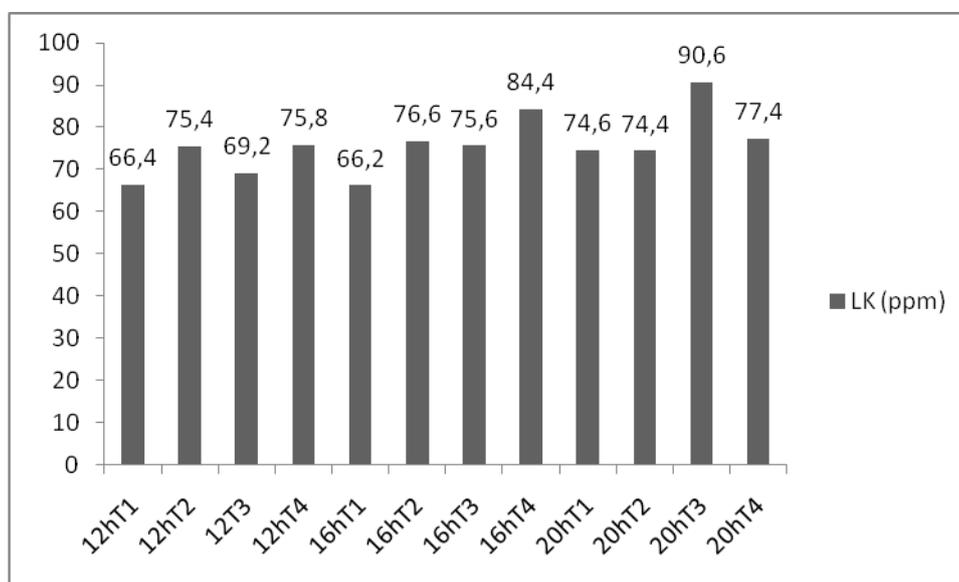


Figura 10. Lixiviação de potássio dos embriões de coco AveJBr criopreservados após 24 horas de incubação em função dos tratamentos de crioproteção.

(T1- 1,75 mol.L⁻¹ de sacarose + 15% de glicerol ; T2- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose + 15% de glicerol; T3- 1,75 mol.L⁻¹ de sacarose e T4- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose)

Esses resultados reforçam os obtidos no teste de condutividade elétrica para os mesmos tratamentos que também apresentaram menores valores, ou seja, provavelmente menor dano na membrana. Vale ressaltar que os valores numéricos da lixiviação de íons potássio são bem menores do que os da condutividade elétrica, porque na condutividade diversos eletrólitos, como Na^+ e Mg^{2+} , contribuem para maiores valores de condutância.

Dessa forma, mais estudos sobre condutividade elétrica são necessários para obtenção de referenciais que possam evidenciar com mais clareza a aplicação de testes de condutividade para análise da qualidade fisiológica de coco criopreservados.

4.2.2 Teste com tetrazólio

Nos resultados apresentados para o controle, 100% dos embriões testados apresentaram coloração avermelhada, ou seja, viabilidade em todas as quatro

concentrações testadas (Figura 11A). Para reforçar a aplicação de testes de tetrazólio na análise da viabilidade dos embriões zigóticos de coco, foram realizados testes de germinação, conduzidos paralelamente ao teste de tetrazólio, no qual também foram obtidos 100% de germinação de plântulas (Figura 11B). Confirmando dessa maneira, a confiabilidade do teste, uma vez que não há na literatura relatos da aplicação desse teste em embriões zigóticos de coco. Segundo Krzyzanowski et al. (1999), a escolha de metodologia adequada para o emprego do teste de tetrazólio deve se basear na facilidade para a diferenciação de tecidos viáveis e inviáveis. Desta forma a concentração de 0,25% de sal de tetrazólio foi selecionada por esta apresentar ótimas condições de visualização de viabilidade dos embriões, reduzindo os custos do teste. Fernandes et al. (2005) utilizando a concentração de 0,5% de tetrazólio em sementes de coquinho azedo distinguiram embriões viáveis de inviáveis. Esses resultados contrastam com o verificado por Merrow (2004) o qual recomenda para palmeiras, em geral, uma secção de endosperma e solução de tetrazólio a 1%.



Figura 11. A- Teste de tetrazólio em embriões zigóticos de coco AveJBr não criopreservado; B- germinação de embriões zigóticos aos 30 dias (controle).

Nos embriões criopreservados pré-tratados com $1,75 \text{ mol.L}^{-1}$ de sacarose + 15% de glicerol (T1) observou-se a maior porcentagem de viabilidade comparado aos demais tratamentos em todos os períodos de imersão. Embriões pré-tratados com T4 obtiveram as menores porcentagens de viabilidade (Tabela 4, Figura 12).

Tabela 4. Viabilidade dos embriões criopreservados de coco AveJBr submetidos a quatro pré-tratamentos de crioprotetores usando o teste de tetrazólio. Aracaju, Embrapa, 2010.

Tempo (horas)	Viabilidade (%)			
	T1	T2	T3	T4
12	80,00 ± 5,00	60,00 ± 16,96	60,00 ± 10,00	45,00 ± 5,00
16	80,00 ± 5,00	45,00 ± 12,25	50,00 ± 13,69	55,00 ± 5,00
20	75,00 ± 7,91	65,00 ± 6,12	55,00 ± 14,58	55,00 ± 5,00

Valores representam a média de 5 repetições ± erro padrão da média.

T1- $1,75 \text{ mol.L}^{-1}$ de sacarose + 15% de glicerol ; T2- $1,75 \text{ mol.L}^{-1}$ de glicose + 15% de glicerol; T3- $1,75 \text{ mol.L}^{-1}$ de sacarose e T4- $1,75 \text{ mol.L}^{-1}$ de glicose

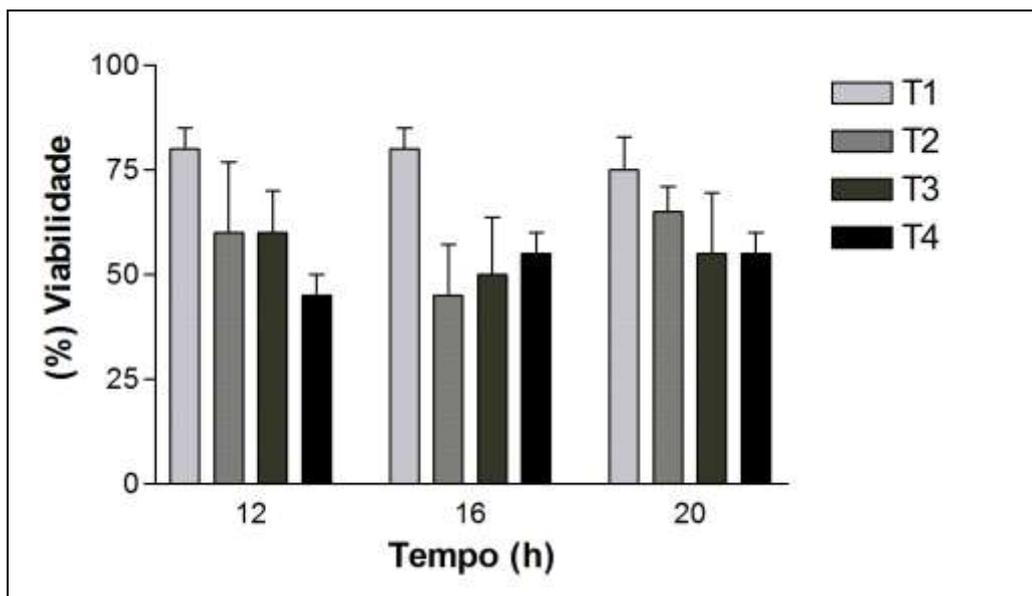


Figura 12. Viabilidade dos embriões zigóticos de coqueiro AveJBr em função dos tratamentos de crioproteção após a criopreservação. Cada coluna representa a média de três repetições \pm erro padrão da média ($P < 0,05$).

(T1-1,75 mol.L⁻¹ de sacarose + 15% de glicerol ; T2- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose + 15% de glicerol; T3- 1,75 mol.L⁻¹ de sacarose e T4- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose)

O teste com tetrazólio foi considerado satisfatório para verificação da viabilidade dos embriões antes e após a criopreservação, entretanto diversos fatores podem ter influenciado negativamente na regeneração dos embriões zigóticos de coco.

4.2.3 Recuperação de embriões criopreservados

Não houve até os 90 dias a germinação dos embriões zigóticos de coco, tanto nos criopreservados (NL+) como nos que foram apenas desidratados (NL-), exceto um embrião do tratamento 12hT1 (NL-) aos 60 dias. Os embriões em condições normais emitem raiz entre 20 a 30 dias após a inoculação, como foi observado na testemunha (embriões não criopreservados).

Nos embriões desidratados (NL-), após 30 dias de avaliação, constatou-se nos tratamentos 12hT1 e 12hT2 um menor intumescimento dos mesmos quando comparados com a testemunha (Figura 13A). Em 16 horas de incubação observou-se o contrário, apenas os tratamentos T3 e T4 apresentaram intumescimento, e em T1 e T2 observou-se pontos de escurecimento na zona meristemática (Figura 13B). Em 20 horas de incubação os embriões apresentaram uma deformação nos tratamentos T1 e T2 (Figura 13C). Aos 60 dias apenas um dos embriões do tratamento 16hT1 (NL-) emitiu a raiz. Entretanto, os embriões nos demais tratamentos apresentaram apenas um maior intumescimento, sendo que aos 90 dias não observou-se nenhuma alteração em todos os tratamentos.



Figura 13. Desenvolvimento de embriões zigóticos de coco AveJBr (NL-) aos 30 dias na etapa de recuperação em meio líquido Y3. A) T-testemunha; T1-12hT1, T2-12hT2, T3-12hT3 e T4-12hT4; B) T-testemunha; T1-16hT1, T2-16hT2, T3- 16hT3 e T4-16hT4; C) T-testemunha; T1-20hT1, T2-20hT2, T3- 20hT3 e T4-20hT4.

(T1-1,75 mol.L⁻¹ de sacarose + 15% de glicerol ; T2- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose + 15% de glicerol; T3- 1,75 mol.L⁻¹ de sacarose e T4- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose)

Nos embriões criopreservados, observou-se após 30 e 60 dias de inoculação pontos de escurecimento na zona meristemática, em todos os tratamentos (T1 e T2) com glicerol (Figuras 13 e 14), como também no 20hT3 (Figura 14C). O escurecimento pode ter ocorrido em virtude da alta concentração de sacarose na solução crioprotetora, ocasionando uma oxidação com conseqüente diminuição da regeneração, o que foi comprovado nas avaliações mensais dos embriões zigóticos em todos os tratamentos mencionados anteriormente. Entretanto, os embriões que foram pré-tratados apenas com sacarose e glicose (T3 e T4), não apresentaram alteração (Figura 14) até os 90 dias.

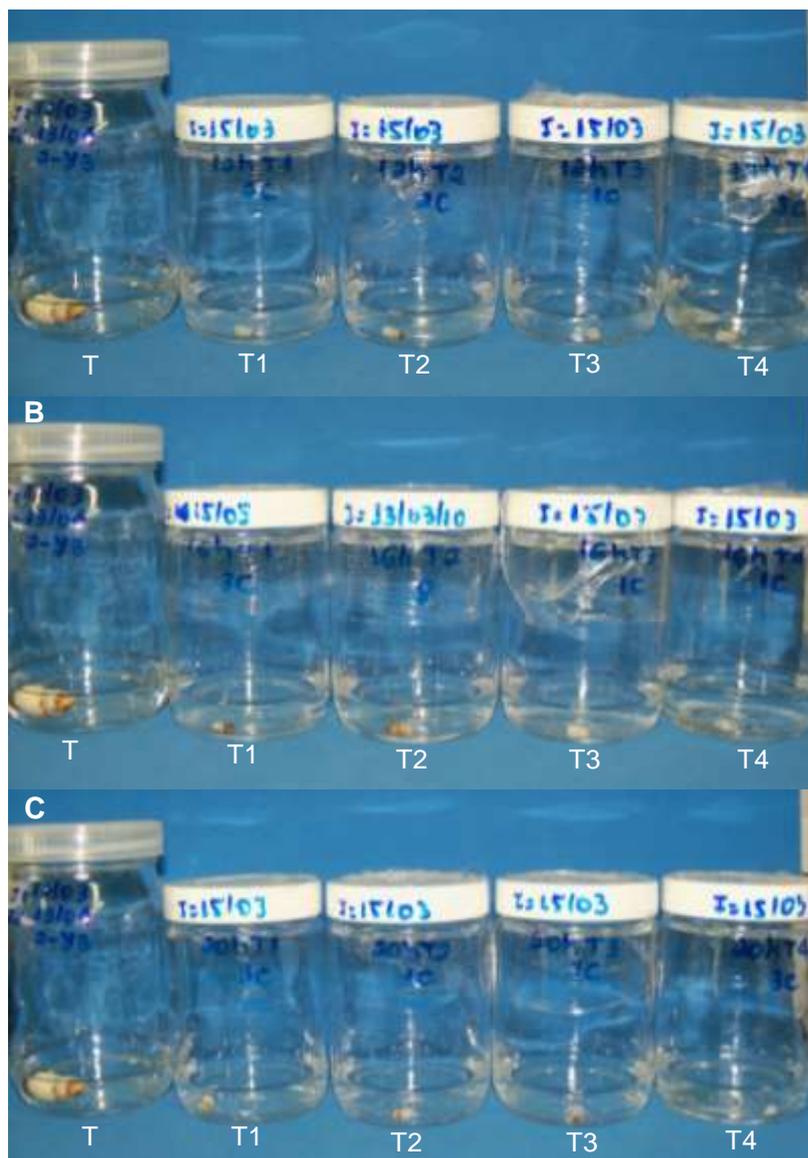


Figura 14. Desenvolvimento de embriões zigóticos de coco AveJBr (NL+) aos 30 dias na etapa de recuperação em meio líquido Y3. A) T-testemunha; T1-12hT1, T2-12hT2, T3-12hT3 e T4-12hT4; B) T-testemunha; T1-16hT1, T2-16hT2, T3- 16hT3 e T4-16hT4; C) T-testemunha; T1-20hT1, T2-20hT2, T3- 20hT3 e T4-20hT4.

(T1-1,75 mol.L⁻¹ de sacarose + 15% de glicerol ; T2- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose + 15% de glicerol; T3- 1,75 mol.L⁻¹ de sacarose e T4- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose)

Panis et al. (1996) relataram que a adição de mais de 0,3 mol.L⁻¹ de sacarose ao meio retardou o crescimento e a proliferação de meristema de banana e causou oxidação intensa dos tecidos. Efeito semelhante foi observado por Santos (2004) ao trabalhar com espécies de *Citrus* em concentrações acima de 0,75 mol.L⁻¹ de sacarose.

Provavelmente a não germinação dos embriões NL- e NL+ até os 90 dias em meio de regeneração Y3 pode ser explicada pelo estresse que os mesmos foram submetidos nas etapas de pré-tratamento com crioprotetores e após a criopreservação, promovendo um atraso no processo de germinação. Santos (2004) melhorou a regeneração dos eixos embrionários de três espécies de *Citrus* em mais de 83% quando adicionou ao meio de pré-tratamento contendo sacarose, glicerol e prolina combinados ou não.

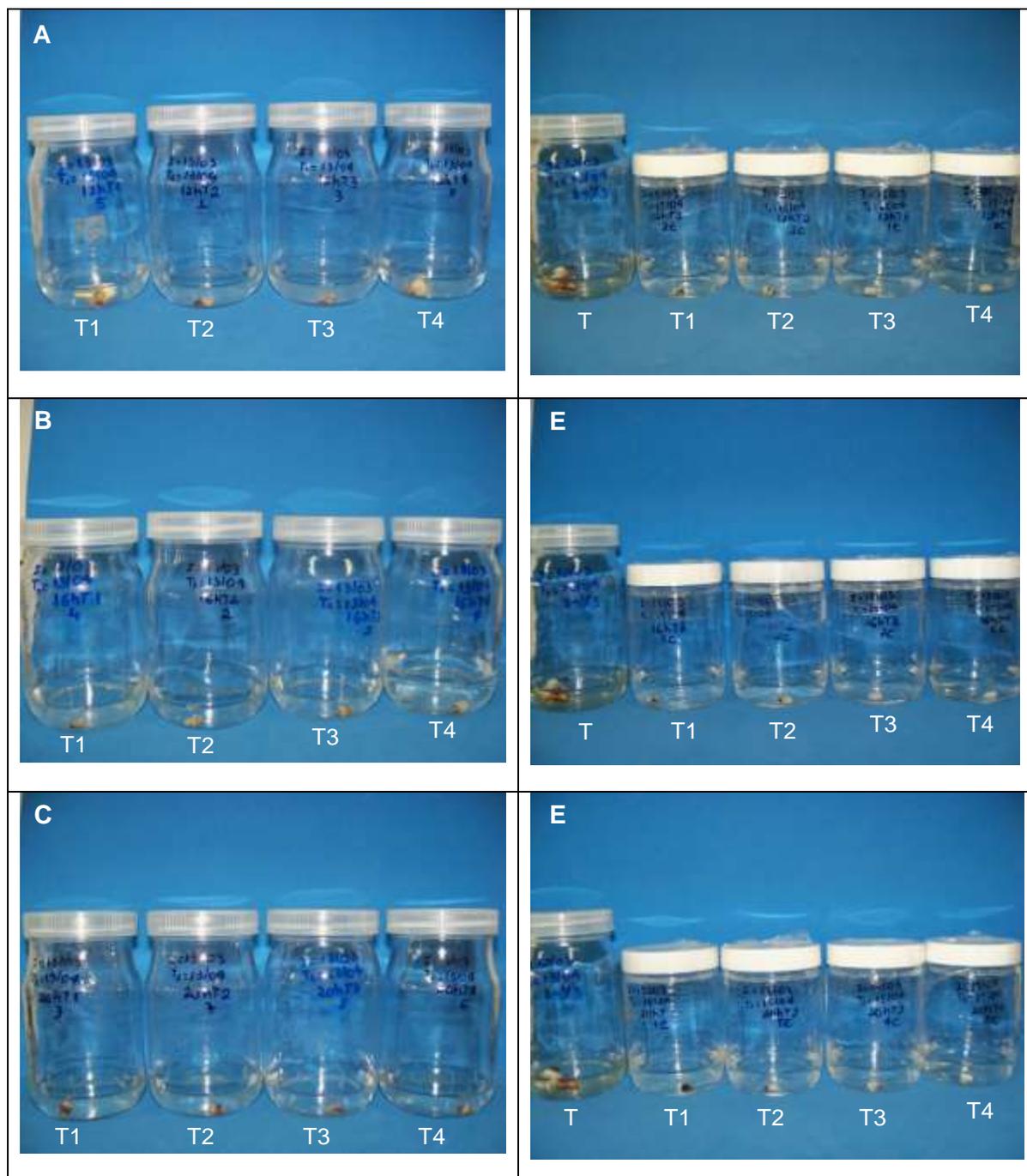


Figura 15. Desenvolvimento de embriões zigóticos de coco AveJBr em NL- (à esquerda) e em NL+ (à direita) aos 60 dias na etapa de recuperação em meio líquido Y3. A) T1-12hT1, T2-12hT2, T3- 12hT3 e T4-12hT4; B) T1-16hT1, T2-16hT2, T3- 16hT3 e T4-16hT4; C) T1-20hT1, T2-20hT2, T3- 20hT3 e T4-20hT4; D) T-testemunha; T1-12hT1, T2-12hT2, T3- 12hT3 e T4-12hT4; E) T-testemunha; T1-16hT1, T2-16hT2, T3- 16hT3 e T4-16hT4; F) T-testemunha; T1-20hT1, T2-20hT2, T3- 20hT3 e T4-20hT4. (T1-1,75 mol.L⁻¹ de sacarose + 15% de glicerol; T2- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose + 15% de glicerol; T3- 1,75 mol.L⁻¹ de sacarose e T4- 1,75 mol.L⁻¹ de glicose)

A sacarose em altas concentrações induz um choque osmótico, o que causa oxidação e redução do crescimento. Esses resultados mostram que apesar dos açúcares não serem compostos tóxicos, é necessário estabelecer concentrações específicas para cada espécie de interesse, pois diferentes tecidos de uma mesma planta podem apresentar limites diferentes de tolerância à presença de sacarose dentro de suas células (SANTOS, 2004).

Outro fator a ser considerado é a necessidade de adição de reguladores de crescimento ou aminoácido ao meio de regeneração Y3 para acelerar o processo de germinação dos embriões criopreservados. Samosir et al. (2008) estudando a germinação de embriões de coco não criopreservados sugeriram adicionar durante o primeiro mês ao meio de regeneração o ácido abscísico (ABA) a $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ para uniformizar a germinação, particularmente quando se usa frutos com diferentes estádios de maturação. A adição de $10 \text{ }\mu\text{M}$ de ácido giberélico também é indicada pelos autores para genótipos distintos. Pencer (1991) obteve sobrevivência de 21% em embriões imaturos de *Theobroma cacao* através do congelamento rápido, somente quando os embriões foram cultivados com sacarose mais ABA.

Vale ressaltar também o fato do coco ser uma espécie recalcitrante aumentando assim a sensibilidade à desidratação, dificultando a regeneração por cultura de embriões. Alternativas para a regeneração dos embriões criopreservados a partir da indução de embriogênese somática podem ser consideradas em futuros estudos.

5 CONCLUSÕES

- A metodologia CPATC com a desidratação inicial dos embriões em crioprotetores e posterior secagem em sílica gel por quatro horas promove as menores umidades nos embriões zigóticos maduros de coco AveJBr.
- O pré-tratamento de embriões zigóticos maduros de coco AveJBr com crioprotetor com $1,75 \text{ mol.L}^{-1}$ de sacarose + 15% de glicerol por 12 e 16 horas promove a menor umidade dos embriões, como também maior viabilidade em testes de condutividade elétrica, lixiviação de potássio e tetrazólio.
- Amostras com 10 embriões são suficientes para análise de condutividade elétrica em embriões zigóticos de coco AveJBr criopreservados ou não.
- O período de incubação de embriões de quatro a oito horas é promissor para análise condutividade elétrica em embriões zigóticos maduros de coco AveJBr não criopreservados.
- A concentração de 0,25% de tetrazólio é indicada para análise de viabilidade de embriões zigóticos maduros de coco AveJBr criopreservados ou não.
- O período de 90 dias não é suficiente para avaliação da germinação de embriões criopreservados.
- Testes de condutividade elétrica e lixiviação de potássio são viáveis para analisar o estado da membrana celular antes e após a criopreservação de embriões zigóticos maduros de coco AveJBr.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. Coco-da-baía. São Paulo: FNP, Consultoria e Agroinformativos, 2009.
- AROCA, R., AMODEO, G., FERNANDEZ-ILLESCAS, S., HERMAN, E. M., CHAUMONT, F., CHRISPEELS, M. J. The role of Aquaporins and membrane damage in chilling and hydrogen peroxide induced changes in the hydraulic conductance of maize roots. **Plant Physiology**, v.137, p. 341–353, 2005.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**, ed. Washington D. C., v. 15, 1141 p. 1990.
- ASSY-BAH, B.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of mature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) and subsequent regeneration of plantlets. **Cryo-Letters**, v. 13, p. 117-126, 1992.
- AZEVEDO, C. A. A. Biotecnologia, biodiversidade e conhecimentos tradicionais. www.cesupa.br/redenorte/doc/material-textos.doc. Acesso em 11 de novembro de 2009.
- BAJAJ, Y.P.S. **Current Science**, v. 53, p. 1215-1216, 1984.
- BARROS. D. I. **Tecnologia de sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes)**. Areia, Universidade Federal da Paraíba, 89 p. 2006 (Tese de doutorado).
- BARRUETO CID, L. P. A propagação *in vitro* de plantas. **Biotecnologia ciência e desenvolvimento**, Brasília, DF, n. 19, p. 16-21, mar./abri. 2001.
- BECQUEREL, P. L'anhydrobiose des tubercules de Renouneules dans l'azote liquide (-196 °C). **Cachier de Recherche de l'Académie de Sciences**, v. 194, p. 1974-1976, 1932.
- BECQUEREL, P. La vie latente des grains de pollen dans la vide a -271 °C au-dessous de zero. **Cachier de Recherche de l'Académie de Sciences**, v. 188, p. 1305-1310, 1929
- BECQUEREL, P. La vie latente des spores ds Mucorinées et des Ascomycètes aux basses températures (-271 °C). **Cachier de Recherche de l'Académie de Sciences**, v. 150, p. 1347-1351, 1910.
- BENASSI, A. C. **Informes sobre a produção de coco**. http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=12743. Acesso em 10 de novembro de 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília-DF: SNDA/DNPV/CLAV, 365 p. 1992.
- CANTO, A. M. M. E.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. C.; SOUZA, A. da S.; LEDO, C. A. da S.; CABRAL, J. R. S. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 717-720, jul. 2004.
- CHAN, E.; ELEVITCH, C. R. Species profiles for Pacific Island. **Agroforestry**, v. 2.1, April 2006.

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

DAMASCO, O. P. Utilization of embryo culture technology for germoplasm conservation: development of medium term conservation for coconut zygotic embryos in the Philipines. In: ENGELMANN, F.; BATUGAL, P.; OLIVER, J. (Ed.) **Coconut in vitro culture: part II**. Serdang: IPGRI-APO, 2002. p. 67-79, 2002.

DUMET, D.; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUCVAL, Y.; DEREUDDRE, J. Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-letters**, v.14, p. 243-250, 1993.

EEUWENS, C. J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 36, p. 23-28, 1976.

ENGELMANN, F.; ASSY-BAH, B. Maintenance of coconut genetic resources - *In vitro* techniques for medium and long term conservation. **Proceedings...** Internacional Workshop on Coconut Genetic Resources, Cipanas Indonesia, p. 8-11, 1991.

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

FABRE, J.; DEREUDDRE, J. encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. **Cryo-letters**, v. 11, p. 413-426, 1990.

FARIA, G. A.; COSTA, M. A. C.; JUNGHANS, T. G.; LEDO, C. A. da S.; SOUZA, A. da S. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de *Plassiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 267-270, 2006.

FERNANDES, R. C.; MAGALHÃES, H. M.; LOPES, P. S. N.; BRANDÃO FONTENELE, R. E. S. Resumos do V CBA – Manejo de Agroecossistemas Sustentáveis. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 2, p. 1004-1007, 2007.

FORTES, G. R. de L.; PEREIRA, J. E. S. Preservação *in vitro* da batata com ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 10, p. 1261-1264, 2001.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. London: Exegetics, v. 1, 1993.

GIACOMETTI, D. C. The management of genetic resources as a component of biological diversity. **Diversity**, v. 8, n. 3, p. 10-13, 1993.

GOEDERT, C. O. Histórico e avanços em recursos genéticos no Brasil. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 25-60, 2007.

GOEDERT, C. O. **Sistema de conservação de germoplasma a longo prazo da Embrapa: modelo inicial**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 21p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 163).

GONÇALVES, K. S.; JUNGHANS, T. G.; VIDAL, A. M. Cultivo *in vitro* de gemas laterais de maracujazeiro amarelo em função da temperatura. In. CONGRESSO BRASILEIRO

DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2003, Porto Seguro. **Anais...** Cruz das Almas, 2003, 1 CD-ROM.

GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; CLAVERO-TAMÍREZ, I.; LÓPEZ-ARANDA, J. M. Review. The use of cryopreservation for germplasm conservation of vegetatively propagated crops. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.2. n.3, p. 341-351, 2004.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C. e CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasília, EMBRAPA-SPI, EMBRAPA-CNPQ, 1998, v. 1, p. 183-260.

GROUT B.W.W., MORRIS, G.J. **The effects of low temperatures on biological systems**. Edward Arnold, London, p. 275, 1987.

HALMAGYI, A.; VĂLIMĂREANU, S.; COSTE, A.; DELIU, C.; ISAC, V. Cryopreservation of *Malus* shoot tips and subsequent plant regeneration. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 15, n.1, Supplement, 2010.

HAO, S-J.; HAO, J-F.; ZHANG, G-J. Effect of solute hydrogen bonding capacity on osmotic stability of lysosomes. **Biochemistry**, Moscou, v.74, n.12, pp. 1363-1367, 2009.

HEYWOOD, V. H. **Global biodiversity assessment**. Cambridge, UK: UNEP: Cambridge University Press, 118 p., 1995.

IBPGR (International Board for Plant Genetic Resources) **Geneflow**: a publication about the earth's plant genetic resources. Rome, Italy, p. 19, 1993.

JÚNIOR, D. S.; FERNANDES, R. C.; GOMES, J. A. O.; PAULINO, M. A.O.; CARNEIRO, P. A. P. Elaboração da metodologia de aplicação do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade das sementes de coquinho-azedo *Butia capitata* (Mart) Becc. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.2, out. 2007.

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

KRZYŻANOWSKI, F.; VIEIRA, R. D.; FRANCA NETO, J. B. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999.

LÉDO, A. S.; CUNHA, A. O.; ARAGÃO, W. M.; TUPINAMBÁ, E. A. Efeito da sacarose e do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento de coqueiro anão. **Magistra**, v.19, n. 4, p. 346-351, out./dez., 2007.

LEDO, A. S.; GOMES, K.K.P. ; BARBOZA, S.B.S.C. ; VIEIRA, G.S.S. ; ARAGÃO, W.M. de ; TUPINAMBÁ, E.A. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimatação de plântulas de coqueiro anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** , v. 42, p. 147-154, 2007.

LEMO, E. E. P. de, FERREIRA, M. de S., ALENCAR, L. M. C. de A., NETO, C. E. R., ALBUQUERQUE, M. M. de. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, out. 2002.

LEOPOLD, A. A. Temperature effects on soybean imbibition and leakage. **Plant Physiology**, v. 65, n. 4, p. 1096-1098, 1980.

- MALAUURIE, B.; BORGES, M. Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) plumules by encapsulation/dehydration. In: International Workshop on Plant Biotechnology-Plant Breeding and Biotechnology, BIOVEG, 2001. **Reports...** Centro de Bioplasmas, Ciego de Avila, Cuba, 2001. p. 59, 2001.
- MALAUURIE, B.; TROUSLOT, M. F.; BERTHAUD, J.; BOUSALEM, M.; PINEL, A.; UBERN, J. Medium-term and long-term *in vitro* conservation and safe international exchange of yam (*Dioscorea* spp.) germplasm. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, Chile, v. 1, n. 3. Disponível em: <http://ejb.ucv.cl/content/vol1/issue3/full/2/2.PDF>. Acesso em: 10 novembro de 2009.
- MARIANTE, A. da S.; SAMPAIO, M. J. A.; INGLIS, M. C. V. **The stat of Brazil's plant genetic resources: Conservation and sustainable utilization for food and agriculture.** Embrapa Technological Information, Brasília, p. 236, 2009.
- MARIN, M.L.; DURAN-VILA, N. Survival of somatic embryos and recovery of plants of sweet Orange (*Citrus sinensis* L. Osb.) after immersion in liquid nitrogen. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 14, p. 51-57, 1988.
- MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J.; BOVI, M. L. A. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de açaí. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, p. 231 – 235, 2009.
- MCT, Ministério da Ciência e Tecnologia. Programa de Biotecnologia e Recursos Genéticos. Definição de Metas. http://www.ctnbio.gov.br/upd_blob/0000/9.pdf. Acessado em 25 mai. 2009.
- MERROW, A. W. **Palm seed germination.** IFAS Cooperative Extension Bulletin, Florida, n. 274, p. 1-10, jun. 2004.
- MCDI. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Secretaria de Comércio Exterior, CIRCULAR n. 42, (publicada no D.O.U. de 30 de julho de 2009). Brasília: Diário Oficial da União, 30 jul. 2009.
- MORAES, R. M.; CALDAS, L. S.; SILVEIRA, C. E. S.; SOUZA, A. V.; BERTONI, B. W.; PEREIRA, A. M. S. **Micropropagação e banco de germoplasma in vitro para produção e conservação de plantas nativas do Cerrado.** In: PEREIRA, A. M. S. (org). Recursos Genéticos e Conservação de Plantas Medicinais do Cerrado. Ana Maria Soares Pereira. Ribeirão Preto, p. 185-212, 2007.
- MROGINSKI, L. A.; ROCA, W. M. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones.** Cali: CIAT, parte A, cap. 2, p. 14-40, 1991.
- NASCIMENTO, W. M. O. **Conservação de sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.).** 2006. 60 f. Tese (Doutorado em Agronomia/ Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- NETO, J. de B. F. O teste de tetrazólio em sementes de soja. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. de. **Testes de vigor em sementes.** Jaboticabal-SP: FUNEP, p. 87-102, 1994.
- N'NAN, O.; VERDEIL, J. L.; HOCHER, V.; KONAN, J. L.; ZAKRA, N.; MALAUURIE, B. Mise au point d'une méthode de cryoconservation d'apex caulinaire de cocotier (*Cocos nucifera* L.). In: Biotechnologies Végétales: Valorisations pour une Agriculture Durable, Journées

Scientifiques du réseau **Biotechnologies, Amélioration des Plantes et Sécurité Alimentaire**, v. 8, p. 152-153, 2002.

PANIS, B. WITHERS, L.A., DE LANGHE, E. Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and subsequent regeneration of plants. **Cryo-latters**, v. 11, p. 337-350, 1990.

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

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

PENCE, V. C. Cryopreservation of immature embryos of *Theobroma cacao*. **Plant Cell Reports**, v. 10, p. 144-147, 1991.

PRITCHARD, H. W. **Cryopreservation of seeds**. In: DAY, J. G.; MCLELLAN, M. R. (Ed.). *Methods in molecular biology: cryopreservation and freeze-drying protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 1995. v. 38. p. 133-144.

RAO, K. N. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n.2, p. 136-145, 2004.

SAKAI A., Survival of twigs of Woody plants at – 196. **Nature**, v. 185, p. 393-394, 1960.

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

SAMOSIR, Y. M. S.; MASHUD, N.; NOVARIANTO, H.; LIEN, V. T. M.; RILLO, E.; MAGDALITA, P.; DAMASCO, O.; KEMBU, A.; FAURE, M. G.; ADRINS, S. W. **A new embryo culture protocol for coconut germplasm conservation and elite-type seedling production**. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, p.14-30, 2008.

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. **Criopreservação de eixos embrionários de espécies de citrus usando o encapsulamento e desidratação**. Brasília, 24 p., 2004, Documentos – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.20, maio/junho, p. 60-65, 2001.

SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N. Criopreservação de germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**, Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 545-573, 2007.

SANTOS, I. R. I.; STUSHNOFF, C. Cryopreservation of embryonic axes of *Citrus* species by encapsulation-dehydration. **Plant Genetic Resouces Newsletter**, v.131, p. 36-41, 2002.

SILVA, V. dos S. **Regeneração *in vitro* de embriões zigóticos de *Cocos nucifera* L.** Piracicaba. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 78 p., 2002. (Dissertação de mestrado).

SOURANDER, L. F. **Noruega inaugura “cofre” global no ártico.** Folha online –Ciência, Bruxelas, artigo 26, fevereiro de 2008. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/folha/ciencia/ult306u376024.shtml>. Acesso em 11 de julho de 2010.

SOUZA, L. A. de; CARVALHO, M. L. M. de; KATAOKA, V. Y.; OLIVEIRA, J. A. de. Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de mamona. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 60-67, 2009.

STANWOOD, P.C. Cryopreservation of seeds: a preliminary guide to the practical preservation of seed germplasm on liquid nitrogen. In: FAO. International Board for Plant Genetic Resources. Advisory Committee on Seed Storage. Report of the second meeting. Rome, 1984, p. 8-27. Appendix 3.

VANZOLINI, S.; NAKAGAWA, J. Teste de condutividade elétrica em sementes de amendoim: Efeitos de temperatura e períodos de embebição. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 21, n.1, p. 41-45, 1999.

VIEIRA, R. D. Teste de condutividade elétrica. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. de. **Testes de vigor em sementes.** Jaboticabal-SP: FUNEP, p. 103-132, 1994.

WILSON, E. O. The current state of biological diversity. In: WILSON, E. O. (Ed.). **Biodiversity.** Washington, DC: National Academy Press, p. 3-20, 1988.

WILSON, E. O. **The diversity of life.** London: Penguin, 275 p., 1992.

WITHERS L. A.; ENGELMANN F. In vitro conservation of plant genetic resources. In: Agricultural Biotechnology. A. Altman, Ed., Marcel Dekker Inc. New York. p. 57-88, 1998.

WITHERS, L. A; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa - CNPH, v. 1, p. 297-330, 1998.

ZHU, G-Y.; GEUNS, J. M. C; DUSSERT, S.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Change in sugar, sterol and fatty acid composition in banana meristems caused by sucrose-induced acclimation and its effects on cryopreservation. **Physiologia Plantarum**, v.128, p.80-94, 2006.