

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura da cebola foi introduzida pelos açorianos no Brasil no século XVIII, nos municípios de Mostardas, Rio Grande e São José do Norte no Estado do Rio Grande do Sul (Garcia, 1990), sendo a terceira hortaliça de maior importância econômica para o país (ICEPA, 2003). Nas regiões Sul e Sudeste, a cebolicultura constitui-se em atividade socioeconômica de significativa relevância para os Estados de São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, nos quais se concentram mais de 76% da produção nacional (Debarba *et al.*, 1998).

A mais importante região produtora do Rio Grande do Sul está situada no litoral Sul, englobando os municípios de Rio Grande, Tavares, São José do Norte e Mostardas (Garcia, 1997) e segundo ICEPA/SC (2003), esses quatro municípios respondem por cerca de 70% da produção de cebola do RS.

Segundo o ICEPA-SC (2003), o Rio Grande do Sul responde por cerca de 14% da produção nacional, o que faz da cebola a segunda hortaliça em importância econômica no estado, sendo apenas superada pela cultura da batata, porém, a área plantada no RS tem apresentado recuo nos últimos anos, diminuindo de 16.648 hectares na safra 98/99, para 14.085 na safra 2002/2003, ocorrendo o mesmo com a produção, que diminuiu de 181.338 toneladas na safra 95/96, para aproximadamente 159.000 na de 2002/2003.

Espécies olerícolas, como a cebola, freqüentemente apresentam problemas de vigor, germinação, estabelecimento do estande e perdem a viabilidade rapidamente pós-colheita se não forem mantidas em condições de armazenamento favoráveis. Devido ao tamanho reduzido, as sementes desta espécie são muito sensíveis aos constantes ciclos de hidratação-desidratação no solo.

A época de semeadura, que se estende de abril a julho, freqüentemente coincide com solos frios no Rio Grande do Sul, além disso, conforme salientam Amaral *et al.* (1987), a produção de sementes de cebola enfrenta uma série de problemas, como a baixa produtividade por área e a baixa qualidade das sementes

obtidas, em alguns anos. Entre outros fatores, esses têm sido apontados como responsáveis pelo abandono da cebolicultura por alguns produtores.

Para preservar os recursos fitogenéticos existentes por longos períodos de tempo, tem sido normalmente utilizado, o banco de germoplasma que representa o conjunto de materiais hereditários de uma espécie. Segundo Towill (2000), este conceito pode ser restrito ao conjunto de genótipos disponíveis para melhoramento de uma espécie cultivada.

A diversidade contida em um germoplasma deve ser protegida de eventuais perdas para garantir a sua utilização, e tem sido coletada nos centros de origem das culturas, isto é, nos locais onde iniciaram os cultivos daquela espécie, ou nas regiões onde se desenvolveram raças locais, para as quais houve migração da cultura.

As coleções de germoplasma são mantidas em instituições diversas que têm por responsabilidade (I) garantir a sua diversidade genética (seja pela iniciativa de coletar periodicamente recursos genéticos, seja por favorecer o intercâmbio com outros bancos de germoplasma), (II) multiplicá-las, (III) distribuí-las aos usuários e (IV) promover a sua caracterização por diferentes metodologias. Essas coleções são ditas *ativas*. Uma segunda forma de conservação é aquela que propõe manter as coleções por períodos longos, sem que se utilize delas para estudo, cessão, intercâmbio, etc. O modo mais usual para se manter uma coleção por prazos mais longos é por crioconservação, isto é, sob temperatura ultra-reduzida.

A conservação de recursos genéticos implica na manutenção de coleções *in situ*, ou seja, nos seus locais de ocorrência, ou *ex situ*. Nesse caso, podem ser mantidos indivíduos, sementes, embriões ou outras estruturas vegetais, sob diferentes condições, dependendo do material utilizado: no campo ou em casas de vegetação, em câmaras secas sob baixa temperatura, em meio de cultura com baixa concentração salina (conservação *in vitro*) ou crioconservadas.

O armazenamento em baixas temperaturas em que se inclui a crioconservação em nitrogênio líquido é um método eficiente e prático para a conservação dos recursos fitogenéticos. Medeiros e Cavallar (1992) definem crioconservação em nitrogênio líquido como sendo a preservação de materiais biológicos a baixas temperaturas (entre -160 e -196°C) onde, sob essa temperatura,

todos os processos metabólicos são essencialmente paralisados e mantidos em estado latente, proporcionando, consequentemente, preservação a longo prazo. Outros autores acrescentam que a crioconservação em nitrogênio líquido é um método potencialmente estudado para reduzir a taxa de deterioração, aumentando assim o tempo de armazenamento das sementes, assegurando ainda a preservação das fontes genéticas da planta, além de reduzir os custos e a perda da viabilidade (Skai e Noshiro, 1975; Stanwood e Bass, 1978; Stanwood e Ross, 1979; Stanwood e Bass, 1981; Stanwood, 1985).

De acordo com o International Board for Plant Genetic Resources - IPBGR (1982), a crioconservação é uma tecnologia indicada para as espécies de propagação vegetativa, espécies com sementes recalcitrantes, germoplasma raros ou mesmo espécies ameaçadas de extinção e espécies de plantas silvestres. Além disso, a conservação em nitrogênio líquido pode ser usada para espécies de sementes de importância agronômica (Stanwood, 1980, 1985 e 1987).

Todos os procedimentos de crioconservação têm em comum, a etapa de preparação da estrutura vegetal a ser conservada para a imersão em nitrogênio líquido. É uma etapa de desidratação para evitar a formação de cristais de gelo no interior da célula, o que é fatal. A desidratação pode ser induzida por cristalização do meio externo durante uma fase lenta de resfriamento até atingir -30°C a -40°C. Transferindo-se rapidamente o material vegetal para o nitrogênio líquido, obtém-se a vitrificação da célula, isto é, os componentes celulares solidificam, formando um vidro, sem haver formação de gelo.

O movimento molecular a baixas temperaturas é super reduzido, não havendo fase líquida na célula. Com isso a possibilidade de perda do material biológico é menor e seu custo aplicativo e financeiro torna-se mais baixo em relação aos da conservação *in vitro*. A metodologia aplicada é baseada, principalmente, na vitrificação (água do estado líquido para sólido amorfo e meta-estável) para evitar a formação de cristais. Porém, a grande dificuldade do processo é a formação desses cristais de gelo no interior das células, que podem causar ruptura das membranas resultando em colapso e morte, como consequência da perda da semipermeabilidade e da compartimentação celular (Salomão, 2002).

Uma alternativa importante para aplicação desta técnica, é submeter o material a agentes crioprotetores, à base de dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, etíleno glicol, metanol e propileno glicol, etc. (Salomão, 2002). Entretanto, esses crioprotetores podem ser tóxicos ou podem causar estresse osmótico, levando à morte as células ou modificando sua resposta morfogenética em cultura (Sakai, 1995). Portanto, se utilizam soluções com baixas concentrações para que haja entrada dos componentes permeáveis na célula e, em seguida, soluções concentradas de crioprotetores para promover a vitrificação, para então, transferir os frascos para o nitrogênio líquido.

Os agentes crioprotetores penetrantes são substâncias ou fármacos que diminuem as lesões de origem química ou mecânica que a congelação causa sobre a célula (Gonzalez, 2004).

Os crioprotetores agem reduzindo os danos celulares causados pelos efeitos da concentração dos sais no meio e possuem estruturas que lhes permitem fazer ligações de hidrogênio com a molécula de água, diminuindo assim a formação de cristais de gelo, não permitindo o aumento de tamanho desses cristais e diminuindo a concentração de soluto nos meios extra e intracelular. Estas ligações de hidrogênio também promovem uma estabilização da estrutura quaternária das proteínas de membrana preservando-as da desidratação. O uso de crioprotetores para os quais as células têm alta permeabilidade resulta em boa sobrevivência celular (Gonzalez, 2004).

Em um banco de germoplasma a baixas temperaturas, não só o processo de crioconservação deve ser levado em consideração como também o método de descongelamento, pois quanto mais rápido ocorrer o descongelamento das sementes, melhor a preservação de suas características fisiológicas. Portanto, o método de descongelamento lento (temperatura ambiente) se torna questionável, uma vez que existe a possibilidade do recongelamento durante este período, necessitando desta forma, estudos em relação aos métodos mais rápidos como o descongelamento em banho-maria (temperatura de 40°C) e a utilização do microondas.

A crioconservação tem sido utilizada como um método alternativo ao banco de germoplasma tradicional, uma vez que a conservação das sementes abaixo de

-130°C permite que o seu metabolismo seja paralisado, impedindo a sua deterioração. A crioconservação tem se mostrado como um método eficiente, prático e de baixo custo na preservação dos recursos fitogenéticos, além de manter a semente viável por longo prazo.

Considerando que as sementes de cebola perdem rapidamente a viabilidade pós-colheita, e por apresentarem alto valor comercial, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da crioconservação na qualidade fisiológica, composição química e índice mitótico de sementes de cebola submetidas a diferentes técnicas.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo foi conduzido no Laboratório Didático de Análise de Sementes (LDAS) do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia e, no Laboratório de Zoologia e Genética do Instituto de Biologia, sendo estes da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS.

Para a realização deste trabalho foram utilizadas sementes de cebola (*Allium cepa* L.), cv. Baia Periforme, de procedência nacional, cedidas pela Feltrin – Importadora de Sementes Ltda.

### **2.1 Crioconservação das sementes**

Para a crioconservação, as sementes de cebola foram colocadas em tubos cilíndricos e crioconservadas em botijões criogênicos durante o período de uma hora, a temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$ .

As técnicas de crioconservação foram as seguintes:

- Imersão em nitrogênio líquido com crioprotetor (glicerol 50%);
- imersão em nitrogênio líquido sem o uso de crioprotetor;

A testemunha não foi imersa em nitrogênio líquido.

### **2.2 Descongelamento das sementes**

Após o tratamento criogênico, as sementes foram descongeladas através dos seguintes métodos:

- descongelamento lento, a temperatura ambiente de  $25^{\circ}\text{C}$  durante duas horas;
- descongelamento em banho-maria, a temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  durante cinco minutos;
- descongelamento em microondas, a uma potência de 70W durante cinco

minutos.

Posteriormente ao descongelamento, as sementes foram lavadas com água destilada.

Antes e após o tratamento criogênico foram avaliados os seguintes parâmetros: teor de água, germinação, vigor (envelhecimento acelerado, primeira contagem, comprimento de raiz e da parte aérea), composição química e análise do ciclo celular e índice mitótico.

O teor de água das sementes foi realizado em três subamostras pelo método da estufa  $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas, conforme as Regras para Análise de Sementes-RAS (Brasil, 1992). Os resultados foram expressos em percentagem.

## **2.3 Qualidade Fisiológica**

### **2.3.1 Teste de germinação**

Foram utilizadas 200 sementes, distribuídas em quatro repetições iguais, semeadas sobre duas folhas de papel mata-borrão, previamente umedecidas com água destilada e mantidas em germinador a temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$ . As avaliações foram realizadas no sexto e décimo segundo dia após a semeadura, de acordo com as RAS (Brasil, 1992). Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

### **2.3.2 Testes de vigor**

➤ Primeira contagem - Conduzido conjuntamente com o teste de germinação. Os resultados foram expressos em porcentagem do número de plântulas normais obtidas no sexto dia após a instalação do teste.

➤ Comprimento da raiz e da parte aérea - Foram utilizadas 150 sementes, distribuídas em três repetições iguais e colocadas para germinar em papel germitest, umedecido com água destilada, na quantidade de 2,5 vezes o peso do papel seco. A semeadura foi efetuada sobre uma linha horizontal traçada no terço superior do

papel umedecido. Os rolos contendo as sementes permaneceram no germinador por seis dias a 20°C, quando então foi procedida a avaliação. Os resultados foram expressos em centímetros.

➤ Envelhecimento acelerado - Foram utilizadas caixas tipo “gerbox”, como compartimento individual (mini-câmara), possuindo em seu interior uma bandeja com tela de alumínio onde as sementes foram distribuídas de maneira a formarem camada uniforme. Em cada compartimento foram adicionados 40mL de água destilada; as caixas, tampadas, foram mantidas em câmara tipo BOD, a 42°C por 72 horas com umidade relativa próxima a 100% (AOSA, 1983). Após o envelhecimento, as sementes foram submetidas ao teste de germinação. Os resultados obtidos foram expressos em percentagem de plântulas normais.

## **2.4 Composição química**

Após o descongelamento, as sementes acondicionadas em envelopes foram mantidas em uma estufa à temperatura de 70°C durante 48 horas e, posteriormente, colocadas no dessecador. As sementes foram moídas e guardadas em câmara fria a -18°C, durante quatro meses até a determinação das avaliações bioquímicas.

Os efeitos da crioconservação sobre os teores de amido, açúcar solúvel e proteínas foram determinados em quatro subamostras de 0,25 gramas de sementes moídas. Os teores de açúcar solúvel foram determinados através das reações com antrona (Clegg, 1956). As determinações de teores de amido foram realizadas com o resíduo dos centrifugados, após a extração do açúcar solúvel, segundo o método descrito por McCready et al. (1950). As proteínas solúveis foram determinadas pela metodologia descrita por Bradford (1976).

As leituras das amostras para o amido e açúcar solúvel foram realizadas em espectofotômetro a 620nm e para proteína a 595nm. Os resultados expressos em µg/g de semente.

## 2.5 Análise do ciclo celular e índice mitótico

Para avaliar a freqüência de divisão celular através do índice mitótico, as sementes foram colocadas para germinar, conforme metodologia descrita anteriormente. Após o sexto dia de semeadura, entre 8 e 10 horas da manhã, foi realizada a coleta do ápice radicular das plântulas normais, quando as mesmas apresentavam, aproximadamente, 1,5 cm de comprimento, as raízes foram colocadas diretamente no fixador Carnoy (3 partes de álcool etílico absoluto : 1 parte de ácido acético glacial), por 24 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, as raízes foram lavadas em água corrente, transferidas para álcool 70% e estocadas em freezer, até a preparação das lâminas.

No preparo das lâminas do ápice radicular, estas foram lavadas duas vezes em água destilada e hidrolizadas em HCl 5N, por 10 minutos, à temperatura ambiente e, novamente, lavadas com água destilada.

Com o auxílio do microscópio estereoscópio, as zonas meristemáticas das raízes foram coletadas e transferidas para lâmina na qual foi adicionado ácido acético 45% para o esmagamento do material. A lamínula foi colocada e o material aquecido e prensado.

Posteriormente, as lâminas foram colocadas dentro de tubos cilíndricos com nitrogênio líquido ( $N_2L$ ), a uma temperatura de -196°C, de forma que ficassem imersas no mesmo, para a retirada da lamínula e fixação do material na lâmina. Após, a lâmina foi lavada e deixada secar ao ar. A coloração foi realizada por imersão em solução de em Giemsa 2%, pH 6,8 por cinco minutos.

A observação do material foi realizada em microscópio ótico, a uma magnitude de 400X. Para a contagem das células em divisão celular adotou-se o método de varredura, partindo do canto inferior da lâmina, da esquerda para a direita. Foram contadas as células em divisão mitótica e em interfase, num total de 100 células por lâmina. A unidade experimental constou de 4 lâminas por repetição. Assim, foram analisadas 400 células por repetição, de três repetições por tratamento, num total de 1.200 células por tratamento. O índice mitótico foi calculado como a percentagem de células em divisão (prófase, pró-metáfase, metáfase, anáfase e telófase) do total de células observadas.

## **2.6 Análise estatística**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial (2X3+1), ou seja, 2 (técnicas de crioconservação) e 3 (métodos de descongelamentos) + testemunha, com três repetições.

As análises de variância e as comparações de médias pelo teste de Duncan ao nível de 5% de significância, foram procedidas com o auxílio do programa computacional SANEST - Sistema de Análise Estatística (Zonta e Machado, 1984).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Qualidade fisiológica das sementes de cebola submetidas a diferentes técnicas de crioconservação.**

Na Tabela 1, são apresentados os resultados da qualidade fisiológica de sementes de cebola submetidas a diferentes técnicas para crioconservação. Verifica-se que as sementes submetidas ao tratamento criogênico, sem crioprotetor, apresentaram germinação e vigor (EA e PC) superior àquelas com uso de crioprotetor. Os parâmetros, comprimento de raiz e da parte aérea das plântulas, não foram sensíveis para mostrar diferenças entre as técnicas utilizadas.

As sementes de cebola imersas em nitrogênio líquido, sem o uso de crioprotetor, mantiveram sua qualidade, não diferindo da testemunha em todos os parâmetros avaliados. Estes resultados confirmam os obtidos por Stanwood e Sowa (1995), ao armazenarem 14 variedades de cebola, nas temperaturas de 5, -18 e -196°C, durante um período de 10 anos e constatarem que a germinação média das sementes mantidas a -18 e -196°C não declinou ao longo do tempo, ficando em torno de 92%, enquanto a germinação de sementes armazenadas a 5°C diminuiu de 94 para 68%.

Entretanto, as sementes crioconservadas com o uso de crioprotetor (glicerol 50%) apresentaram um decréscimo acentuado na germinação (22 pontos percentuais), envelhecimento acelerado (66 pontos percentuais) e na primeira contagem (46 pontos percentuais). Esses resultados não estão de acordo com os obtidos com sementes de orégano, onde a crioconservação sob ação do glicerol como crioprotetor, apresentaram valores de germinação superiores aquelas submetidas ao nitrogênio sem glicerol, indicando a necessidade do uso do glicerol como crioprotetor para conservação destas sementes (Vargas *et al.*, 2004).

Observa-se na Tabela 2, que na crioconservação, sem crioprotetor, o teor de água das sementes foi mantido após o descongelamento independentemente do método utilizado, não diferindo da testemunha. Já na técnica de crioconservação,

com crioprotetor, houve um aumento de 42 pontos percentuais no teor de água das sementes após os três métodos de descongelamento, evidenciando que o glicerol 50%, utilizado como crioprotetor, aumentou acentuadamente o teor de água das sementes. O glicerol é químicamente considerado um álcool que contém três grupos funcionais de hidroxila que podem aceitar um hidrogênio da molécula de água em seis sítios diferentes (Gonzalez, 2004). O glicerol 50% pode ser utilizado para reduzir o dano físico e favorecer o processo de vitrificação durante a etapa de congelamento a temperaturas ultrabaixas, entretanto é importante observar o comportamento das sementes de diferentes espécies em presença deste crioprotetor.

Na presente pesquisa, as sementes crioconservadas, com uso de crioprotetor, apresentaram média de teor de água de 49,5%, provavelmente este alto teor de água contribuiu para a redução da qualidade fisiológica das sementes. O teor de água das sementes é um dos principais fatores controladores da crioconservação. Existe um nível máximo de umidade para o congelamento (High Moisture Freezing Limit - NMU) acima do qual a viabilidade da semente é reduzida durante o mesmo (Stanwood, 1985). Este limite crítico é, em geral, uma faixa relativamente estreita de umidade para cada espécie, mas pode variar entre espécies.

Diversos pesquisadores mostraram a importância do teor de água das sementes na crioconservação. Chadel et al. (1995), ao crioconservarem sementes recalcitrantes de chá (*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze) e de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.), constataram que o teor de água adequado para crioconservação foi de 14% e que acima desse valor as sementes perderam sua capacidade germinativa. Sementes de alface foram danificadas ao serem crioconservadas com mais de 18% de umidade (Roos e Stanwood, 1981). Resultados semelhantes foram obtidos na crioconservação de sementes de *Sesamum indicum* com 12% de umidade (Stanwood, 1987).

O estresse de congelamento, com o uso de crioprotetor, pode ter causado a interrupção e desestruturação de alguns processos metabólicos assim como reportados por Fleck et al. (1999) e Dumet e Benson (2000) com outros sistemas biológicos. Alguns crioprotetores podem ser tóxicos ou podem causar estresse

osmótico, levando à morte das células ou modificando sua resposta morfogenética em cultura (Sakai, 1995). Também, é possível que os danos observados na crioconservação possam ter sido causados pela perda da integridade celular devido a formação de cristais de gelo e ao emprego do crioprotetor, que pode danificar membranas, conforme descrito no trabalho realizado por Martínez-Montero et al. (2002).

**TABELA 1 – Qualidade das sementes de cebola submetidas a diferentes técnicas de crioconservação, quanto à germinação (G), envelhecimento acelerado (EA), primeira contagem (PC), comprimento de raiz (CR) e comprimento de parte aérea (CPA).**

Técnicas de crioconservação	G (%)	EA (%)	PC (%)	CR (cm)	CPA (cm)
<b>Sem crioprotetor</b>	93 a	89 a	76 a	1,6 a	1,4 a
<b>Com crioprotetor (glicerol 50%)</b>	70 b	27 b	39 b	1,7 a	1,4 a
<b>Testemunha</b>	92 a	93 a	85 a	2,1 a	1,8 a
<b>CV (%)</b>	4,67	7,01	5,39	12,61	11,54

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

### **3.2 Qualidade fisiológica das sementes de cebola após diferentes métodos de descongelamento.**

Na Tabela 2, são apresentados os valores médios de germinação e vigor das sementes de cebola crioconservadas e submetidas a diferentes métodos de descongelamento.

As sementes crioconservadas, com o uso de crioprotetor, e descongeladas pelas diferentes metodologias utilizadas, apresentaram um decréscimo acentuado na qualidade fisiológica em todos os parâmetros avaliados. A redução na germinação foi em média de 32 pontos percentuais. O percentual de germinação foi de 50; 67 e 64%, respectivamente, após o descongelamento em ambiente, banho-maria e microondas. Para os parâmetros de vigor analisados, as diminuições de

qualidade também foram acentuadas, evidenciando que a crioconservação, com uso de crioprotetor, não foi adequada para sementes de cebola. Também, foi observada por Stonayova (1994), redução na viabilidade de sementes de milho crioconservadas por um período de 10 anos.

Por outro lado, as sementes quando crioconservadas, sem o uso de crioprotetor, apresentaram valores de germinação, igual ou superior a 92%, para todos os métodos de descongelamento estudados, não diferindo em relação à testemunha, embora tenha ocorrido redução no vigor para todos os métodos de descongelamento.

O conjunto dos testes mostra que o descongelamento em ambiente foi o que mais prejudicou a qualidade das sementes, com ou sem uso de crioprotetor. As técnicas de descongelamento por banho-maria e microondas, não apresentaram diferenças entre si, para a maioria dos parâmetros de qualidade avaliados. Esses resultados confirmam a afirmativa de Pita Villamil (1997), que os métodos mais rápidos de descongelamento se adaptam melhor a crioconservação, pois métodos lentos, segundo o autor, possibilitam o recongelamento das sementes. Há controvérsias quanto à velocidade de descongelamento adequada para garantir a integridade do material quando exposto ao nitrogênio líquido. Stawood e Bass (1981) indicam o descongelamento lento para evitar danos nos tecidos e células da semente.

Um parâmetro importante que deve ser definido para cada procedimento é o período em que o material pode ser conservado de tal forma que, quando avaliado, mostre pelo menos 60% de sobrevivência (Van den Houve *et al.*, 1995, citado por Vieira, 2000). Os resultados apresentados nesta pesquisa mostram que a crioconservação, sem uso de crioprotetor, manteve a germinação das sementes de cebola. Estes resultados são promissores e demonstram que sementes de cebola podem ser crioconservadas, com relativa eficiência, se, conforme Diniz (1999), forem estudados alguns parâmetros como: teor de água mais adequado, técnicas de congelamento e métodos de descongelamento.

Ao avaliar o efeito do tratamento criogênico em sementes de 60 espécies de plantas tropicais, Salomão (2002) observou que somente nove espécies tiveram sua germinação prejudicada, concluindo que a crioconservação pode ser uma alternativa

promissora para o armazenamento de um grande número de espécies. Ao avaliarem o poder germinativo de sementes crioconservadas de orquídea do gênero *Bratonia*, Popov et al. (2004) concluíram, da mesma forma, que a crioconservação não afetou a germinação das sementes.

**TABELA 2 - Qualidade das sementes de cebola crioconservadas e submetidas a diferentes métodos de descongelamento, quanto ao teor de água (TA), germinação (G), envelhecimento acelerado (EA), primeira contagem (PC), comprimento de raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CPA).**

Técnicas de crioconservação	Métodos de descongelamento	TA (%)	G (%)	EA (%)	PC (%)	CR (cm)	CPA (cm)
<b>Sem crioprotetor</b>	Ambiente	7,4 a	93 a	84 b	74 b	1,3 b	1,1 c
	Banho-maria	7,2 a	94 a	88 ab	75 b	1,4 b	1,3 b
	Microondas	7,4 a	93 a	90 ab	71 b	1,4 b	1,2 c
	Testemunha	7,5 a	92 a	93 a	85 a	2,1 a	1,8 a
<b>Com crioprotetor (glicerol 50%)</b>	Ambiente	49,6 a	50 c	9 b	9 c	1,8 b	1,1 c
	Banho-maria	49,2 a	67 b	6 b	35 b	1,5 b	1,5 b
	Microondas	49,6 a	64 b	11 b	31 b	1,4 b	1,1 c
	Testemunha	7,5 b	92 a	93 a	85 a	2,1 a	1,8 a
<b>CV (%)</b>		1,77	4,67	7,01	5,39	12,62	11,54

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

### 3.3 Composição química

Na Tabela 3, encontram-se os valores da composição química – amido, proteína e açúcar solúvel das sementes de cebola submetidas às diferentes técnicas de crioconservação.

Observa-se que a técnica de crioconservação, sem o uso de crioprotetor, não alterou a composição química das sementes de cebola, ou seja, manteve os

teores de amido, proteína e açúcar solúvel, não diferindo da testemunha. Entretanto as sementes crioconservadas, com o uso de crioprotetor (glicerol 50%), apresentaram maior teor de amido, possivelmente, devido aos efeitos tóxicos do glicerol no processo de vitrificação nas sementes.

Os menores teores de proteína e açúcar solúvel indicam inibição da atividade metabólica, provavelmente, devido ao aumento no teor de água das sementes pelo crioprotetor, capaz de promover danos às membranas celulares e ainda possivelmente à toxicidade do glicerol (Stanwood, 1985). Apesar de o glicerol ser o crioprotetor mais utilizado no congelamento de sêmen de espécies domésticas, seus efeitos deletérios sobre os espermatozoides ocorrem, provavelmente, pelas alterações causadas na membrana plasmática (Soares *et al*, 2002). Caso seja necessário o uso de crioprotetores para viabilizar o processo de crioconservação, deverá haver um esforço para diminuir a toxicidade do crioprotetor utilizando-se diferentes grupos químicos, concentrações e ainda adequando o tempo de exposição. Entretanto, estudando os efeitos do glicerol na viabilidade de micélio de fungos, foi observado que não houve influência do contato com o crioprotetor na recuperação dos micélios (Herrera *et al.*, 1998).

Esses resultados evidenciam que a técnica de crioconservação, sem o uso do crioprotetor, foi adequada para sementes de cebola, não alterando a composição química nem a germinação das sementes. Na preservação de materiais biológicos a baixas temperaturas (entre -160 e -196°C), todos os processos metabólicos são essencialmente paralisados e mantidos em estado latente, proporcionando consequentemente preservação indefinida (Medeiros e Cavallar, 1992).

**TABELA 3 - Composição química das sementes de cebola submetidas a diferentes técnicas de crioconservação, quanto ao teor de amido (TAm), teor de proteína (TP) e teor de açúcar solúvel (TAS).**

<b>Técnicas de crioconservação</b>	<b>TAm</b>	<b>TP</b>	<b>TAS</b>
	<b>(μg/g de semente)</b>		
<b>Sem crioprotetor</b>	1607,1 b	40,3 a	37,8 a
<b>Com crioprotetor (glicerol 50%)</b>	2112,7 a	20,6 b	24 b
<b>Testemunha</b>	1796,1 b	35,8 a	38,6 a
<b>CV (%)</b>	16,8	9,0	12,8

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Na Tabela 4, são apresentados os valores da composição química (amido, proteína e açúcar solúvel) das sementes de cebola submetidas a diferentes métodos de descongelamento.

Os resultados confirmam os obtidos na avaliação da qualidade fisiológica, que o tratamento criogênico, com o uso de crioprotetor (glicerol 50%), não foi adequado para as sementes de cebola. Todos os métodos de descongelamento alteraram o teor de proteína e açúcar solúvel das sementes.

Observa-se que, sem o uso de crioprotetor, não houve diferença no teor de amido das sementes independentemente do método de descongelamento utilizado; o teor de açúcar solúvel, também, não foi alterado, quando o descongelamento foi realizado em banho-maria e microondas. Já o teor de proteína se manteve somente quando o descongelamento foi realizado em microondas.

Considerando que a composição química das sementes não deve ser alterada durante a crioconservação, o descongelamento em microondas foi o mais adequado, pois manteve inalterado o teor de amido, proteína e açúcar solúvel. Esses resultados confirmam que, quanto mais rápido e uniformemente ocorrer o descongelamento das sementes, melhor a preservação de suas características fisiológicas. Logo o método de descongelamento lento (temperatura ambiente) se torna questionável, uma vez que existe a possibilidade do recongelamento durante este período. As etapas de secagem, acondicionamento e congelamento das

técnicas de crioconservação são importantes e devem ser ajustadas. Porém, a adequação da forma de descongelamento tem sido a etapa limitante no processo.

**TABELA 4 - Sementes de cebola crioconservadas e submetidas a diferentes métodos de descongelamento, quanto ao teor de amido (TAm), teor de proteína (TP) e teor de açúcar solúvel (TAS).**

<b>Técnicas de crioconservação</b>	<b>Métodos de descongelamento</b>	<b>TAm</b>	<b>TP</b>	<b>TAS</b>
		( <b>µg/g de semente</b> )		
<b>Sem crioprotetor</b>	Ambiente	1522,9 a	40,9 ab	30,2 b
	Banho-maria	1297,5 a	44,9 a	40,6 a
	Microondas	1812,0 a	39,8 bc	41,6 a
	Testemunha	1796,1 a	35,8 c	38,6 a
<b>Com crioprotetor (glicerol 50%)</b>	Ambiente	2497,5 a	16,2 bc	19,7 b
	Banho-maria	2227,5 ab	18,3 b	17,9 b
	Microondas	1929,5 b	12 c	19,8 b
	Testemunha	1796,1 b	35,8 a	38,6 a
<b>CV (%)</b>		16,8	9,0	12,8

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Com base nas informações obtidas neste estudo constata-se que o tratamento criogênico, sem uso de crioprotetor, é uma técnica adequada para a crioconservação de sementes de cebola, pois não altera a germinação e composição química das sementes. Também é possível afirmar que o descongelamento em microondas é o mais adequado.

### **3.4 Ciclo celular e índice mitótico**

As estimativas das frequências de células, nas diferentes fases do ciclo celular, que são a interfase e a divisão celular (prófase, prometáfase, metáfase,

anáfase e telófase), ocorrentes no meristema do ápice radicular de sementes de cebola crioconservadas, estão apresentadas na Tabela 5.

Ao serem comparadas cada uma das diversas fases do ciclo celular de cada tipo de descongelamento, em cada técnica de crioconservação, verificou-se que as sementes crioconservadas, sem o uso do crioprotetor, não diferiram daquelas crioconservadas com glicerol 50%, com exceção das fases de interfase e de prófase descongeladas tanto em banho-maria quanto em microondas. Estes valores estatisticamente diversos foram os seguintes:

- interfase x banho-maria x sem crioprotetor = 72,59%
- interfase x banho-maria x com crioprotetor = 86,28%
  
- prófase x banho-maria x sem crioprotetor = 22,31%
- prófase x banho-maria x com crioprotetor = 10,37%
  
- interfase x microondas x sem crioprotetor = 81,84%%
- interfase x microondas x com crioprotetor = 88,08%
  
- prófase x microondas x sem crioprotetor = 14,34%
- prófase x microondas x com crioprotetor = 7,77%

Em todas as técnicas de crioconservação, a maior freqüência é de células interfásicas, comparativamente às fases da divisão celular, variando na técnica de crioconservação, sem o uso de crioprotetor, de 72,59% (banho-maria) a 88,36% (testemunha), apresentando uma freqüência média de 81,83%, conforme Tabela 5. Já, com o uso do crioprotetor, a freqüência de células em interfase variou de 81,64% (ambiente) a 88,36% (testemunha), apresentando uma freqüência média de 86,19%.

Esta maior freqüência de células interfásicas é a esperada, pelo fato da interfase ser a fase mais longa do ciclo celular na maioria das células de organismos eucariotos. O ciclo celular das células somáticas está dividido em duas fases: a interfase e a divisão celular ou mitose. A interfase é constituída pelas fases G1 (crescimento celular), S (duplicação dos cromossomos) e G2 (preparo para a divisão celular). A mitose, que produz duas células filhas, é habitualmente seguida pela citocinese (separação das células filhas), e está constituída pelas fases de prófase,

prometáfase, metáfase, anáfase e telófase. Estes períodos têm durações diversas de acordo com a célula e/ou organismo estudado. O ciclo celular de uma célula de ponta de raiz de cebola é de cerca de 17,40 horas (Vant' Hof, 1965, citado por Singh, 2003). O ciclo celular da *Vicia faba* é de cerca de 20 horas, das quais apenas 10% é dispendido pela mitose, sendo os períodos G1, S e G2 da interfase responsáveis por 25%, 40% e 25%, respectivamente (Viégas, 2004). Excetuam-se algumas fases da embriogênese em que, nas primeiras divisões do zigoto, as fases G1 e G2 da interfase são suprimidas, diminuindo drasticamente o tamanho da interfase (Cooper, 2001; Alberts *et al.*, 2002).

Ao se utilizar o índice mitótico para comparar, de modo geral, as técnicas de crioconservação verifica-se que as mesmas diferem entre si. A técnica de crioconservação, sem o uso de crioprotetor, apresentou um índice mitótico médio igual 18,17% enquanto que com crioprotetor teve um índice mitótico médio de apenas 13,81% (Tabela 5).

O índice mitótico é muito utilizado em bíoensaios de toxicologia ambiental, para estimar a toxicidade de agentes químicos, tais como fármacos, quimioterápicos, herbicidas, fungicidas, entre outros, utilizando, para tal, células vegetais, animais e humanas. Entre as espécies utilizadas, destaca-se a cebola, da qual são utilizadas as células de ponta de raiz para os testes de índice mitótico e micronúcleos, as células de ovário de hamster Chinês (células CHO) e os linfócitos humanos, ambos cultivados *in vitro*, para o índice mitótico e o teste de aberrações cromossômicas (Repetto *et al.*, 2001; Robust Summary, 2003)

Ao mesmo tempo em que é analisado o índice mitótico, são observadas e anotadas as alterações cromossômicas, tais como pontes anafásicas em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L., após serem submetidas a estresse gravitacional (Khaleel, 2001), ou aumento de células anormais em arruda crioprotegida com glicerol e criopreservada (Sebaje *et al.*, 2003).

**TABELA 5. Freqüência de células do ápice radicular de sementes de cebola crioconservadas e submetidas a diferentes métodos de descongelamento em seis fases do ciclo celular: Interfase (I), Prófase (P), Pró-metáfase (Pm), Metáfase (M), Anáfase (A) e Telófase (T).**

Técnicas de crioconservação	Métodos de descongelamento	Interfase (% células)	Ciclo Celular					Índice Mitótico (% células)
			P	Pm	M	A	T	
Sem crioprotetor	Ambiente	83,22 b A	11,15 b B	4,04 a C	0,41 a D	0,55 ab D	0,58 b D	16,78 b
	Banho-maria	72,59 c A	22,31 a B	1,71 ab C	0,99 a C	0,91 ab C	1,33 ab C	27,40 a
	Microondas	81,84 b A	14,34 b B	0,80 b CD	0,75 a CD	0,25 b D	1,65 ab C	18,16 b
	Testemunha	88,36 a A	4,06 c B	1,77 ab BC	1,06 a C	1,85 a BC	2,38 a BC	11,64 b
<b>Freqüência média (%)</b>		81,83 A	12,14 B	1,93 C	0,78 D	0,79 D	1,41 CD	18,17*
Com crioprotetor (glicerol 50%)	Ambiente	81,64 b A	12,99 a B	3,00 a C	0,62 a D	0,65 ab D	0,76 a D	18,36 a
	Banho-maria	86,28 ab A	10,37 ab B	1,26 a C	0,62 a C	0,25 b C	1,03 a C	13,72 a
	Microondas	88,08 a A	7,77 b B	1,51 a C	0,11 a D	0,55 ab CD	1,29 a C	11,92 a
	Testemunha	88,36 a A	4,06 c B	1,77 a BC	1,06 a C	1,85 a BC	2,38 a BC	11,64 a
<b>Freqüência média (%)</b>		86,19 A	8,48 B	1,84 C	0,54 E	0,73 DE	1,30 CD	13,81**

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Resultados semelhantes foram encontrados por Sebaje et al (2003), ao analisarem a instabilidade cromossômica de arruda crioconservadas. Estes autores encontraram índice mitótico igual a 2,8% na testemunha. Já, as raízes crioconservadas sem crioprotetor apresentaram índice mitótico de 5,0%, enquanto que a crioconservação associada ao uso de crioprotetor (glicerol), levou à diminuição do índice mitótico (1,2%).

A freqüência de células em divisão aponta para um tecido em franco crescimento, como é o esperado em meristemas vegetais, tais como os das raízes primárias. Estes tecidos apresentam maior ou menor suscetibilidade a diversos estresses bióticos ou abióticos, indicando tanto a toxicidade de uma determinada substância, como os casos anteriormente citados, quanto o nível de reação em função de um genótipo determinado. Analisando a reação de cultivares de cevada suscetíveis e resistentes ao alumínio do solo, Eckert (1994) ressaltou a diminuição do índice mitótico para ambas as cultivares, apesar do resultado diferencial entre as mesmas. O índice mitótico mede, indiretamente, o crescimento de raízes de diversas plantas com relação a suas reações a metais pesados, como é o caso do trigo, comum e duro, do centeio e do triticale (Camargo *et al.*, 1998).

Comparando todas as fases do ciclo celular dentro cada método de descongelamento, tanto da técnica de crioconservação sem o uso do crioprotetor como com o uso do crioprotetor, verifica-se que a frequência de células em prófase difere não só da interfase, mas também das demais fases da divisão celular (Pm, M, A e T), conforme a Tabela 5.

As células em prófase, crioconservadas sem o uso do crioprotetor, descongeladas em banho-maria apresentaram uma frequência superior (22,31%) aos demais métodos, o que, também, explica de certa maneira a diminuição de células em interfase com o conseqüente aumento do índice mitótico (27,40%). Para aquelas crioprotegidas, a frequência de células em prófase foi maior para o descongelamento no ambiente (12,99%), diferindo tanto da testemunha (4,06%), como em microondas (7,77%), relação esta que se inverte na interfase.

As fases da pró-metáfase, metáfase, anáfase e telófase não caracterizaram nenhuma das técnicas de crioconservação, nem os métodos de descongelamento, apresentando percentagens muito baixas, que variaram de 0,11%, freqüência

encontrada para células de ponta de raiz em metáfase obtidas de sementes crioprotegidas e descongeladas em microondas, a 4,04%, das células em pró-metáfase do material sem crioprotetor e descongelado em temperatura ambiente (Tabela 5).

Em trabalho realizado com inseticidas, que apresentam dois tipos diferentes de ingredientes ativos, Chauan et al. (1999) observaram que ambos inibiram a divisão mitótica, induziram quebras e aberrações cromossômicas em meristemas de raiz de cebola. Ao trabalhar com diferentes concentrações de nitrato de chumbo, Liu (1994) observou que o mesmo reduziu o crescimento de raízes e causou irregularidades mitóticas, como pontes anafásicas e cromossomos com aderências, em células de meristema de raiz de *Allium cepa*. A redução do crescimento de raízes foi devida à diminuição da freqüência de divisão celular produzida por este microelemento (ou metal pesado).

O estudo do índice mitótico é muito utilizado para verificar efeitos geno e citotóxicos dos processos de manipulações agrárias, tais como criopreservação e tratamento de sementes com fungicidas. Assim, podem ser citados os trabalhos com criopreservação de sementes de arruda (Sebaje et al., 2003) e com sementes agroecológicas de cebola (Rodrigues et al., 2004). Resultados, em termos de índice mitótico, variam muito não só de espécie para espécie, mas também entre estudos realizados com a mesma espécie, devido a respostas diferenciais dos genótipos das cultivares utilizadas pelos pesquisadores. Isto mostra a importância do uso de sementes de mesmo genótipo e do estabelecimento de um tratamento controle/testemunha. Santiago e Cannen (1999) verificaram ser de 56,9% o índice mitótico de cebola. Segundo Iganci et al. (2003), o índice mitótico de raízes de *Allium cepa* utilizadas como o grupo controle em estudos toxicológicos foi de 5,20%.

#### **4. CONCLUSÕES**

A imersão em nitrogênio líquido, sem o uso de crioprotetor (glicerol 50%), é uma técnica adequada para a crioconservação de sementes de cebola.

O tratamento criogênico, sem uso de crioprotetor (glicerol 50%), não altera a germinação nem a composição química das sementes de cebola, sendo também o tratamento que apresenta maior número de células em divisão celular em todos os métodos de descongelamento estudados;

O tratamento criogênico, com uso de glicerol 50% como crioprotetor, é prejudicial à qualidade fisiológica e altera a composição química de sementes de cebola.

O método de descongelamento das sementes crioconservadas de cebola em microondas é mais adequado do que em temperatura ambiente e banho-maria, porém este último apresenta índice mitótico maior do que os demais tratamentos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. New York: Garland Science, 2002. 1463 p.

AMARAL, A.S.; GARCIA, A.; CASTRO, C.; STUMPF, C.L.; MORAES, E.C.; MADAIL, J.C.M.; DYNIA, J.F.; BICCA, L.H.F.; CARVALHO, R.P.L. **Cultura da cebola para sementes no Rio Grande do Sul**. Pelotas: EMBRAPA/CNPFT, 1987. 71 p. (Circular Técnica, 12)

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigor testing handbook**. East Lansing: AOSA, 1983. 93 p. (Contribution, 32)

BRADFORD, M.M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. **Analytical Biochemistry**, n.72, p.248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília:SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.

CAMARGO, C.E.O.; FERREIRA FILHO, A.W.P.; FREITAS, J.G. Avaliação de genótipos de centeio, triticale, trigo comum e trigo duro quanto a tolerância ao alumínio em solução nutritiva. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.55, n.2, 1998.

CHANDEL, K.P.S.; CHAUDHURY, R.; RADHAMANI, J.; MALIK, S.K. Desiccation and freezing sensitivity in recalcitrant seed of tea, cocoa and jackfruit. **National Plant Tissue Culture Repository**, New Delhi, v.76, p.443-450, 1995.

CHAUAN, L. K. S.; SAXENA, P. N.; GUPTA, S. K. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environmental and Experimental Botany**, v.42, n.3, p. 181-189, 1999.

CLEGG, K.M. The application of the anthrone reagent to the estimation of starch in cereals. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.7, p.40-44, 1956.

COOPER, G.M. **A Célula**: uma abordagem molecular. Porto Alegre:ARTMED, 2001. 712 p.

DEBARBA, J.F.;THOMAZELLI, L.F.; GANDIN, C.L.; SILVA, E. **Cadeias produtivas do Estado de Santa Catarina**: Cebola. Florianópolis: EPAGRI, 1998. 115 p. (Boletim Técnico, 96)

DINIZ, P.S.C. **Qualidade fisiológica das sementes de milho (*Zea mays* L.) submetidas a diferentes técnicas de crioconservação**. 1999. 80f. Dissertação, Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande, 1999.

DUMET, D.; BENSON, E.E. The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed.). **Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm**: current research progress and application. Japan: International Research Center for Agricultural Science; Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p.43-56.

ECKERT, M.I. **Efeito do alumínio tóxico na divisão celular em ponta de raiz de cevada (*Hordeum vulgare* L.)**. 1994. Dissertação, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1994.

FLECK, R.A.; DAY, J.G.; CLARKE, K.J.; BENSON, E.E. **CryoLetters**, London, v. 20, p.271-282, 1999.

GARCIA, A. **Revista del Espacio Rural**, Zaragoza, v. 5, 1997.

GARCIA, A. **Versão preliminar de um programa estadual de produção e comercialização de bulbos e sementes de cebola**. EMBRAPA/IPAGRO/MARA/EMATER, 1990. 68p. (Publicação avulsa)

GONZALEZ, R.A.F. **Efeito da criopreservação usando técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino**. Pirassununga: RAF, 2004. 92p.

HERRERA, I.L.; MATA, G., HERNÁNDEZ, R.G. Evaluation of the viability of *pleurotus* spp. strains after liquid nitrogen cryopreservation. **Iberoam. Micol.**, Veracruz, México, n.15, p.44-47, 1998.

ICEPA-SC. **Informes conjunturais sobre a cultura da cebola.** Disponível em: <<http://www.icepa.com.br>>. Acesso em: 23 jan. 2003.

IGANCI, J.R.V.; HEIDEN, G.; STEIN, V. BÜTTOW, M.V.; VARGAS, D.P.; ROCHA, B.H.G.; BOBROWSKI, V.L. Ação do extrato aquoso de duas espécies de malva sobre a germinação e divisão celular de *Allium cepa* (Liliaceae). In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTIFICA DA UCPEL, 12., 2003, Pelotas. **Anais...** Pelotas: UCPEL, 2003.

INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES. **The design of seed storage facilities for genetic conservation.** Rome, 1982. 95 p.

KHALEEL, T.F. Genotoxic effects of hypo e hypergravity in *Allium cepa* L. **American Society for Gravitational and Space Biology** - Annual Meeting Abstracts, n. 11, p.48, 2001.

LIU, D.; JIANG, W.; WANG, W.; ZHAO, F.; LU, C. Effects of lead on root growth, cell division, and nucleolus of *Allium cepa*. **Environmental Pollution**, v.86, n.1, p.1-4, 1994.

MARTÍNEZ-MONTERO, M.E.; MORA, N.; QUIÑONES, J.; GONZÁLEZ-ARNAO, M.T.; ENGELMANN, F.; LORENZO, J.C. Effect of cryopreservation on the structural and functional integrity of cell membranes of sugarcane (*Saccharum* sp.) embryogenic calluses. **CryoLetters**, London, v. 23, p. 237-244, 2002.

McCREADY, R.M.; GUGGOLZ, J.; WENS, H.S.. Determination of starch and amylase in vegetables. **Analytical Chemistry**, v.22, p.1156-1158, 1950.

MEDEIROS, A.C.S.; CAVALLAR, D.A.N. Conservação de germoplasma de aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. All.) EngL). **Revista Brasileira de Sementes**, v.14, n.1, p.713-75, 1992.

PITA VILLAMIL, J. Crioconservación de semillas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 26., 1997, Campina Grande, PB. **Minicurso.** Campina Grande:UFPB/SBEA, 1997. p.55.

REPETTO, G.; JOS, A.; HAZEN, M.; MOLERO, M.L.; PESO, A., DEL SALGUEIRO, M.; CASTILLO, P.; RODRIGUEZ-VICENTE, M.C.; REPETTO, M. A test battery for the ecotoxicological evaluation of pentachlorophenol. **Toxicology in vitro**, v.15, p.503-509, 2001.

ROBUST Summary 2003. **Bisphenol a Bisimide**. Disponível em: <<http://www.epa.gov/chemrtk/1hisoin/C15016rs.pdf>>. Acesso em: 06 set. 2004.

RODRIGUES, A.D.C.; ÁVILA, P.F.V.; MOLINA, T.F.; SOUZA, J.A.; MOURA, I.F.T.; VIÉGAS, J. Ciclo celular de germinação de sementes de cebola em sistemas de produção convencional e agroecológico. In: Seminário Panamericano de Semillas, 19., 2004, Asunción. **Anais...** Asunción: FELAS, 2004. p.377.

ROOS, E.E. e STANWOOD, P.C. Effects of low temperature, cooling rate and moisture content on seed germination of lettuce. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, n. 106, p.30-34, 1981.

SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**. v. 32. Cryopreservation of plant germplasm I. Berlin: Springer-Verlag; New York: Heiderberg, 1995. p.53-69.

SALOMÃO, A.N. Respostas de sementes de espécies tropicais à exposição ao nitrogênio líquido. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.14, n.2, p.133-138, 2002.

SANTIAGO, F.I.; CANNEN, R.E.L. Mitotic index and chromosomal changes in *Allium cepa* as affected by an organophosphate pesticide, Malathion. **Philippine Journal of Science**, v.128, n.1, p.1, 1999.

SEBAJE, C.M.Z.; TEIXEIRA; F. B.; VINHOLES; P.S.; SANTOS; T.C.O.; SIMÕES, V.M.; DODE, L.B. Avaliação preliminar da instabilidade cromossômica em arruda (*Ruta graveolens* L.) criopreservada. In: CONGRESSO DE INICIACÃO CIENTÍFICA DA UCP, 12., 2003, Pelotas. **Anais...** Pelotas: UCP, 2003.

SINGH, R.J. **Plant cytogenetics**. 2 ed. Flórida: CRC, 2003. p.59-72.

SKAI, A.; NOSHIRO, M. Some factors contributing to the survival of crop seeds cooled to the temperature of liquid nitrogen. In: (Ed.) **Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow**. v.2. Cambridge University, 1975. p.317-326.

SOARES, M.P.; ROSSI, C. A. R.; MEZZALIRA, A. Etileno glicol na criopreservação de sêmen canino. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.4, p.649-655, 2002.

STANWOOD, P.C. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: (Ed.). **Cryopreservation of plant cell and organs**. Flórida: CRC, 1985. p.199-236.

STANWOOD, P.C.; ROSS, E.E. Seed storage of several horticultural species in liquid nitrogen (-196°C). **HortScience**, v.14, p.628-630, 1979.

STANWOOD, P.C. Survival of sesame (*Sesamum indicum* L.) seed at the temperature of liquid nitrogen (-196°C). **Crop Science**, v.27, p.327-331, 1987.

STANWOOD, P.C. Tolerance of crop seeds to cooling and storage in liquid nitrogen (-196°C). **Journal of Seed Technology**, n.5, p.26-31, 1980.

STANWOOD, P.C.; BASS, L.N. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.9, p.423-437, 1981.

STANWOOD, P.C.; BASS, L.N. Ultracold preservation of seed germplasm. In: (Ed.). **Plant cold hardiness and freezing stress**. Academic Press, 1978. p.361-371.

STANWOOD, P.C.; SOWA, S. Evaluation of onion (*Allium cepa* L.) seed after 10 years of storage at 5, -18 and -196°C. **Crop Science**, v.35, p.852-856, 1995.

STONAYOVA, S.D. Seed storage for genetic conservation in the Bulgarian Genebank. In: FRISON, E.A.; BOLTON, M. (Ed.). **Proceedings of a joint FAO/IPGRI workshop on ex situ germplasm conservation**. Rome: FAO/IPGRI, 1994.

TOWILL, L.E. Germplasm preservation. In: TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. (Ed.). **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. 2 ed. Florida: CRC, 2000. p.337-353.

**VARGAS; D.P.; ROCHA, C.L.; ROCHA, B.H.G.; DODE, L.B.; BOBROWSKI, V.L.**  
Efeito do glicerol como pré-condicionante na criopreservação de sementes de *Origanum vulgare* L. **UCPel, 2004.**

VIÉGAS, J. **Estrutura cromossômica em interfase e divisão.** n.p., 2004.

VIEIRA, M.L.C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.3, n.14, p.18-20, 2000.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.D. **SANEST**: Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores. Pelotas: UFPel, 1984. (Registro na Secretaria Especial de Informática – Categoria A).