



Armazenamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae

Míriam Goldfarb*

Maria Elita Martins Duarte

Mário Eduardo R. M. Cavalcanti Mata

Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Campina Grande
CEP 58429-900, Campina Grande – PB, Brasil

*Autor para correspondência
miriam.gold@hotmail.com

Submetido em 13/08/2009
Aceito para publicação em 18/01/2010

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade fisiológica de sementes de pinhão manso armazenadas em nitrogênio líquido, a temperatura de -196°C e no vapor de nitrogênio a -170°C , por períodos de 0, 30, 60 e 90 dias. As sementes foram armazenadas em botijões criogênicos, que mantêm o nitrogênio nas fases líquida e vapor. Os parâmetros avaliados foram germinação e vigor obtidos no 14º dia depois da semeadura.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, empregando-se duas temperaturas (-170°C e -196°C) e quatro períodos de criopreservação (0, 30, 60 e 90 dias). Foram utilizadas quatro repetições de cinquenta sementes por tratamento e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos fatores quantitativos comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Com os resultados obtidos conclui-se que: as sementes mantiveram a sua viabilidade durante os períodos de armazenamento criogênico e os índices mais satisfatórios com relação ao vigor foram obtidos durante o período de criopreservação, indicando que as sementes de pinhão manso podem ser armazenadas nas temperaturas criogênicas estudadas.

Unitermos: criopreservação, espécies oleaginosas, qualidade fisiológica

Abstract

Cryogenic storage of seeds of physic nut (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae. The aim of the present study was to evaluate the physiological quality of seeds of physic nut during cryogenic storage at -196°C (liquid nitrogen) and -170°C (vapor of nitrogen) for periods of 0, 30, 60 and 90 days. The seeds were stored in cryogenic containers filled with liquid and vaporized nitrogen. Evaluation parameters were the seed germination and the plantlet vigor 14 days after sowing. The statistical delineation was completely randomized. A factorial analysis between two temperatures (-170°C and -196°C) and four cryopreservation periods (0, 30, 60 and 90 days) was employed. Four repetitions of fifty seeds per treatment were used. Data were submitted to variance analysis and the means were compared by Tukey's test at 5% of probability. We concluded that cryopreserved seeds maintained their viability after cryogenic storage and satisfactory vigor indices were obtained after the cryogenic treatments, showing that seeds of the physic nut can be stored under cryogenic temperatures.

Key words: cryopreservation, oily species, physiological quality

Introdução

Com a crise atual do petróleo, os estudos com combustíveis alternativos, intensificaram-se e o biodiesel reaparece como uma das soluções imediatas, podendo ser produzido através de óleos vegetais e óleos de origem animal. O biodiesel faz parte do ciclo ecológico e pode ser utilizado puro ou associado ao diesel. Produtos alternativos ao petróleo, seja o etanol ou o biodiesel, são capazes de diminuir a poluição na atmosfera por emitir CO₂ em menor quantidade quando comparado com a emissão de CO₂ pelos combustíveis fósseis (Beltrão, 2002).

Dentre as oleaginosas, o pinhão manso é um vegetal cujas sementes têm se destacado por produzir óleo com todas as qualidades necessárias para ser transformado em óleo diesel (Arruda et al., 2004). É planta rústica, perene, adaptável a diversos ambientes e condições edafoclimáticas, é tolerante à seca, sendo cultivada como cerca viva, em quase todas as regiões tropicais. Outros atributos estão relacionados ao óleo, pois não é comestível e, portanto, não seria desviado para a alimentação humana (Saturnino et al., 2005). No Brasil, o pinhão manso vem sendo cultivado por produtores do Nordeste, Centro Oeste e Sudeste, com produção anual de 1.100 a 1.700L de biodiesel/óleo/ha (Nunes, 2007).

Com relação ao tema deste trabalho, pesquisas a respeito da criopreservação de sementes de espécies de interesse econômico estão sendo cada vez mais estudadas; haja vista que a criopreservação, tem por função a preservação dos recursos genéticos dessas espécies para seleção, melhoramento genético e manutenção de estoques para o futuro. O desenvolvimento de protocolos de criopreservação tem permitido que sementes de diversas espécies possam ser armazenadas a um custo relativamente baixo, em um ambiente que possibilite a preservação da integridade física e biológica do produto agrícola (Touchell e Dixon, 1994).

A técnica de criopreservação consiste em conservar o material biológico em temperaturas ultra-baixas, em nitrogênio líquido, a -196°C, ou em seu vapor, em torno de -170°C. A esta temperatura, a divisão celular e os processos metabólicos cessam ou são paralisados e mantidos em estado latente, podendo o material

permanecer armazenado por tempo indefinido sem alterações em sua estrutura (Coelho, 2006).

Quando se demonstrou, pela primeira vez, há quarenta anos, a possibilidade de criopreservar eficientemente esperma animal, a técnica tem se difundido para armazenar células vivas por longos períodos. Em vegetais, esta técnica é utilizada para a preservação de células de órgãos, da mesma forma para conservação de germoplasma e de material gerado em condições de laboratório (Abdelnour, 1999; Engelmann e Engels, 2002; Santos, 2000). Entretanto, a capacidade de tecidos vegetais sobreviverem à criopreservação depende da sua tolerância à desidratação e à temperatura do nitrogênio líquido (-196°C), em razão disto, o desenvolvimento de um protocolo para criopreservação requer um conhecimento de mecanismos bioquímicos e biofísicos com a resposta dos tecidos à desidratação e ao congelamento (Stushnoff e Seufferhed, 1995).

Segundo Gonzaga et al. (2003), a forma mais correta de conservar os recursos genéticos vegetais é preservá-los no meio no qual se encontram em estado de equilíbrio cuja probabilidade de rompimento seja pequena. De acordo com Bachiller (1997), porém, isto nem sempre é possível, sendo que a semente é a forma pela qual a planta sobrevive o máximo de tempo com o mínimo de atividade fisiológica. Por isso, a forma mais fácil de armazenar os recursos fitogenéticos é por meio da conservação de suas sementes.

Os bancos de sementes constituem um método de conservação de recursos genéticos vegetais *ex situ* amplamente empregado. Em geral, o armazenamento de muitas espécies se faz em temperaturas e umidades baixas podendo, desta forma, serem preservados por décadas e, mais tarde, germinadas, sem prejuízo de sua viabilidade (Büttow, 2005).

A conservação de sementes em nitrogênio líquido oferece inúmeras vantagens sobre os demais métodos de conservação por garantir preservação indefinida do germoplasma armazenado. O uso de nitrogênio líquido a -196°C tem sido recomendado como meio de conservação potencial para germoplasma-semente em longo prazo (Medeiros et al., 1992).

As sementes de pinhão manso apresentam teores de óleo que varia entre 30 e 45%, e com todas as características

para a síntese de biocombustível; segundo pesquisas realizadas por Jocker e Jepsen (2003), as sementes são ortodoxas e, à temperatura ambiente, podem permanecer viáveis por, pelo menos um ano; contudo, devido ao seu conteúdo de óleo não é recomendado um armazenamento prolongado porque as sementes oleaginosas são mais suscetíveis ao ataque de patógenos e pode ocorrer a rancificação dos ácidos graxos que compõem o óleo. É uma espécie que se encontra em processo de domesticação, e tem sido frequente a ocorrência de problemas relacionados às sementes que apresentam germinação irregular e perda do poder germinativo após alguns meses de armazenamento (Severino et al., 2006). Saturnino et al. (2005) explicam que a diminuição da capacidade germinativa que ocorre durante o período de armazenamento a temperatura ambiente é devido a um processo de deterioração que ocorre gradativamente durante o tempo de estocagem. Então, a crioconservação consiste em uma opção de armazenamento desta oleaginosa, pois um ambiente com temperaturas criogênicas proporcionará a redução do metabolismo, resultando na conservação das sementes, por períodos considerados indefinidos. Então é relevante investigar sobre a crioconservação das sementes dessa espécie como uma alternativa ao armazenamento convencional, e prolongar os períodos de crioarmazenagem.

Assim, objetivou-se, neste estudo, avaliar a qualidade fisiológica de sementes de pinhão manso submetidas ao armazenamento criogênico nas temperaturas de -170°C (vapor de nitrogênio) e -196°C (nitrogênio líquido).

Material e Métodos

Este trabalho foi desenvolvido no Setor de Criogenia do Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas da Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola, da Universidade Federal de Campina Grande, PB, em conjunto com o setor de Manejo Cultural da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA, Unidade Algodão, localizada em Campina Grande.

Utilizaram-se sementes (material ainda não padronizado pelas Regras para Análise de Sementes)

recém-colhidas de pinhão manso, safra 2007, provenientes da Embrapa Semi-Árido, em Petrolina, PE.

Crioconservação das sementes

Foi estabelecido o Teor de Água Limite para Crioconservação (TALC) seguindo a metodologia proposta por Goldfarb (2008). Em seguida, as sementes com 8% de água em base úmida foram crioarmazenadas em nitrogênio líquido a -196°C e no vapor a -170°C , durante 0, 30, 60 e 90 dias. Para este procedimento, as sementes foram acondicionadas em tubos cilíndricos de alumínio (canister), separadas por dias de armazenamentos, e colocadas em botijões criogênicos isolados com vácuo parcial, o que confere, ao botijão, a capacidade de manter o nitrogênio em estado líquido (-196°C) e no estado de vapor (-170°C) (Cavalcanti Mata et al., 2004).

Após os períodos de crioarmazenamento, as sementes foram submetidas a um descongelamento gradativo (-196 ; -170 ; -80 ; 10°C e temperatura ambiente) com intervalo de três horas para cada temperatura, de acordo com metodologia proposta por Almeida et al. (2002). Com as sementes descongeladas realizaram-se os testes de qualidade fisiológica.

Teste de germinação

Após crioconservadas e descongeladas, as sementes de pinhão manso foram submetidas ao teste de germinação em bandejas de plástico com 56cm de comprimento, 31,5cm de largura e 7,0cm de altura, com substrato vermiculita umedecida com água destilada e regada sempre que ressecado pelo ar do ambiente. A avaliação foi realizada no 14º dia após a semeadura, considerando-se germinadas as sementes que emitiram no mínimo de 30mm de radícula. Este ensaio foi realizado em casa de vegetação com temperatura média de $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de 63%. Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes por tratamento.

Teste de vigor

Os testes de vigor foram realizados pelo comprimento de plântula e peso de matéria seca, realizado no 14º dia

após a semeadura. Para a determinação do comprimento das plântulas foi utilizado um paquímetro com precisão de 0,01mm, sendo avaliada a altura das plântulas normais (sistema radicular desenvolvido, presença de hipocótilo e cotilédones). Consideraram-se para a determinação do peso seco das plântulas, as plântulas normais de cada repetição, retirando-as do substrato e colocando-as em sacos de papel separados por tratamento; em seguida, foram colocadas para desidratar em estufa a $70 \pm 3^\circ\text{C}$, por 72h, período de tempo que foi alcançado o peso constante; decorrido este período, foram colocadas para resfriar em um dessecador, durante 15 min e, logo após, pesadas em balança eletrônica, com precisão de 0,01g. O peso seco foi calculado por meio da fórmula proposta por Vieira e Carvalho (1994).

Análise estatística

O delineamento estatístico empregado foi o inteiramente casualizado, com arranjo fatorial de duas temperaturas (-170 e -196°C) e quatro períodos de criopreservação (0, 30, 60 e 90 dias), empregando-se quatro repetições por tratamento. Foi realizada análise de variância e a comparação das médias dos tratamentos foi obtida teste de Tukey. O programa computacional utilizado foi Assistat, versão 7.4 (Silva, 2006).

Resultados e Discussão

Os resultados da análise de variância dos valores médios de germinação e vigor das sementes de pinhão manso, em função do tempo de armazenamento criogênico (0, 30, 60 e 90 dias) e temperaturas (-170°C e -196°C) indicam efeito significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F, apenas para o fator período de armazenamento (F_1) com relação ao vigor (comprimento de plântulas e peso da matéria seca). Não houve diferença estatisticamente significativa para os fatores: períodos de armazenamento (F_1), temperaturas de armazenamento (F_2) e interação ($F_1 \times F_2$) indicados para a germinação.

Verifica-se na Tabela 1, que a média de germinação observada nos tratamentos foi de 63%; não houve diferença do ponto de vista estatístico entre os períodos

de armazenamento e as temperaturas. Acerca do vigor, notou-se diferença estatisticamente significativa entre o período 0 (testemunha) em comparação com os períodos de armazenamento criogênico, sendo os valores que correspondem aos períodos de criopreservação estatisticamente superiores.

As sementes de pinhão manso apresentavam um teor de água em torno de 8% em base úmida, baixos teores de umidade tornam o material biológico mais favorável ao congelamento, pois evita a formação de cristais de gelo que causam danos ao tecido. Está é uma hipótese a ser considerada para explicar a preservação da qualidade fisiológica. Uma outra questão é que neste estudo foram analisados três períodos de criopreservação, sendo o último período de 90 dias, porém seria interessante prolongar o período de criopreservação, para ter uma análise mais detalhada sobre a qualidade das sementes nessas condições de armazenamento. Com relação ainda aos períodos de congelamento criogênico, Coelho (2006) relata em sua pesquisa com sementes de algodão, que até os 180 dias não são observados efeitos significativos com os resultados da qualidade fisiológica, com 240 dias observa-se um decréscimo considerável nos valores de germinação e vigor. Comportamento similar foi observado por Almeida et al. (2002), com a criopreservação de duas variedades de sementes de mamona; segundo os autores, para o fator período de criopreservação verifica-se maior germinação aos 30 dias retornando ao nível inicial, aos 60 dias da criopreservação.

Saturnino et al. (2005) relatam que as sementes de pinhão manso quando recém-colhidas apresentam dormência, então esses resultados também são devidos, provavelmente, às mudanças de temperatura e à expansão do nitrogênio líquido durante o reaquecimento, que originaram quebra de dormência,

Resultado semelhante foi obtido por Tresena (2004) que estudou a criopreservação de sementes de ipê amarelo e ipê rosa; este material biológico foi submetido a igual período de criopreservação (0, 30, 60 e 90 dias), e se concluiu que não houve alteração com os índices de germinação e vigor para a interação períodos versus temperatura de criopreservação. De acordo com esta pesquisa, não houve diferença estatisticamente

TABELA 1: Valores médios de germinação e vigor (comprimento de plântulas = C.P; e peso de matéria seca = P.M.S) das sementes de pinhão manso em função das temperaturas e períodos de armazenamento.

Fatores	Germinação (%)	Vigor	
		C.P (cm)	P.M.S (g)
Temperatura criogênica -170°C	64 a	9,3 a	10,5 a
Temperatura criogênica -196°C	62 a	9,5 a	10,6 a
DMS	9,7	0,8	1,8
Períodos de armazenamento (dias)			
0	60 a	7,7 b	6,9 b
30	66 a	9,8 a	12,8 a
60	63 a	10 a	11,4 a
90	62, a	8,4 a	11,9 a
Média	63,2	8,9	10,7
DMS	18,4	1,6	3,4
CV%	21,14745	12,40219	23,2749
Teste F			
Períodos de armazenamento (F ₁)	0,3158 ns	7,4183**	8,5156**
Temperaturas de armazenamento (F ₂)	0,1382 ns	0,5480 ns	0,0295ns
F ₁ x F ₂	0,1382 ns	0,2717 ns	0,0978ns

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. F = estatística do teste F; ** = significativo ao nível de 1% de probabilidade; * = significativo ao nível de 5% de probabilidade; ns = não significativo.

significativa entre as temperaturas criogênicas de -170°C e -196°C com relação aos valores de viabilidade e acúmulo de matéria seca, para as duas espécies de ipê estudadas.

Ainda em relação aos períodos de exposição de sementes ao nitrogênio, tanto na fase líquida como na fase de vapor, ressalta-se a pesquisa realizada por Stanwood (1980) testando a tolerância de sementes de diversas espécies de leguminosas em temperaturas ultra-baixas. O autor obteve valores significativamente distintos entre si e observou que, na maioria dos casos, a extensão do tempo em nitrogênio líquido aumentou o percentual de germinação. Rocha (2004) estudou os períodos de 5, 30, 60, e 90 dias de crioarmazenamento de sementes de algodão e constatou que, com o aumento do período de permanência das sementes expostas às temperaturas criogênicas, a germinação e o vigor também aumentam. Diniz (1999) que pesquisou a crioconservação de sementes de *Zea mays*, notou que os percentuais germinativos depois das sementes permanecerem 90 dias em nitrogênio líquido e na fase de vapor, são superiores a 75%. González-Benito et al. (1998) estudando a viabilidade de sementes crioarmazenadas de algodão, verificaram aumento

do potencial germinativo das sementes de algumas cultivares, após imersão em nitrogênio líquido; fato semelhante ocorreu com Batista (2000) que obteve, para duas variedades de *Sesamum indicum*, maior percentual germinativo depois de 60 dias das sementes imersas em nitrogênio líquido.

Chandel et al. (1995), todavia, afirmam que ocorre um decréscimo do percentual germinativo durante a crioarmazenagem devido à sensibilidade de algumas sementes ao frio, caracterizado por injúrias durante o período de crioconservação. Coelho (2006) que trabalhou com a qualidade fisiológica de sementes de diferentes cultivares de algodão durante a exposição às temperaturas ultra-baixas, observou que a germinação e o vigor das sementes da cultivar BRS 200 marrom são afetados negativamente pela utilização da crioconservação, constatando um decréscimo nesses valores, com o decorrer do armazenamento.

As sementes de pinhão manso não sofreram injúrias durante a exposição ao nitrogênio líquido a -196°C e nem na fase de vapor a -170°C. Este material é tolerante ao armazenamento às temperaturas ultra-baixas. Com relação ao vigor nas sementes de pinhão manso que foi determinado pelo peso da matéria seca

e pelo comprimento das plântulas, constata-se que as sementes mantiveram os mesmos índices, ou seja não houve alteração significativa entre os períodos de 30, 60 e 90 dias, é importante ressaltar que as sementes submetidas às temperaturas criogênicas cessam sua atividade metabólica evitando o desgaste e a perda de energia, mantendo-se em estado de latência, nessa situação ocorre à preservação das estruturas físicas e bioquímicas da semente e como consequência podem proporcionar os bons resultados de germinação e vigor. O descongelamento lento que foi realizado nessa pesquisa, pode ter influenciado para preservar a qualidade fisiológica, Coelho (2006) constatou em seu trabalho com sementes de algodão, que nas temperaturas de -170 e -196°C, o método de descongelamento à temperatura ambiente (lento), produziu maiores valores para o vigor. Porém, Almeida et al. (2000) pesquisaram a crioconservação de algumas sementes de leguminosas e obtiveram respostas heterogêneas; para os autores, nem o teor de água, tamanho das sementes e velocidade de resfriamento ou de reaquecimento, parecem justificar as respostas observadas para a imersão em nitrogênio líquido das sementes avaliadas.

De acordo com Jocker e Jepsen (2003) as sementes de pinhão manso são ortodoxas, ou seja, toleram a desidratação até um teor de água em torno de 5 a 7% b.u., e com esse quantitativo de água podem ser armazenadas sem ocorrer danos. Santos (2000) afirma que alguns materiais vegetais ainda se mostram sensíveis ao congelamento, como é o caso das sementes recalcitrantes. A diversidade de resposta entre as diferentes espécies de plantas, ou mesmo entre diferentes tecidos de uma mesma espécie, dificulta a generalização e o desenvolvimento de um protocolo de crioconservação de caráter universal.

Com relação à criação de um banco de germoplasma, é importante estabelecer critérios para definir as espécies prioritárias, baseados na importância econômica e social, potencial de mercado e erosão genética (Vieira, 2001). O pinhão manso contém sementes ricas em óleo e com potencialidades para fornecer matéria-prima para a síntese de biodiesel, ou seja, uma fonte de energia alternativa; imprescindível, portanto, criação de bancos de germoplasma para esta oleaginosa a fim de se analisar

os recursos genéticos e conservar fontes de genes para uso nos programas de melhoramento genético.

Conclui-se que as sementes de pinhão manso podem ser crioconservadas tanto no vapor (-170°C) como na imersão (-196°C) em nitrogênio líquido. As sementes mantiveram a sua viabilidade e os seus índices de vigor durante os períodos de crioconservação.

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Capes pela bolsa de pesquisa e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Embrapa Algodão por fornecer matéria-prima e casa de vegetação.

Referências

- Abdelnour, A. 1999. Crioconservation de plants, estado actual de la investigacion em Costa Rica. **Agronomia Costarricense**, 23 (2): 205-214.
- Almeida, F. de A. C.; Morais, A. M. de.; Carvalho, J. M. F. C.; Gouveia, J. P. G. 2002. Crioconservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 6 (2): 295-302.
- Almeida, F. de A. C.; Pita Villamil, J. M.; Gouveia, J. P. G. de. 2000. Efeito de la crioconservación sobre la germinación de semillas de leguminosas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, 2 (1): 67-71.
- Arruda, F. P. de.; Beltrão, N. E. de M.; Andrade, A. P. de A.; Pereira, W. E.; Severino, L. S. 2004. Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, 8 (1): 789-799.
- Bachiller, C. G. 1997. **Semillas de arboles y arbustos forestales**. ICONA (M.A.P.A.), Madrid, España, 992pp.
- Batista, R.C. 2000. **Cultivo in vitro e crioconservação de sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L.)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, Brasil, 83pp.
- Beltrão, N. E. de M. 2002. Informações sobre o biodiesel, em especial com o óleo de mamona. **Embrapa Algodão Documento**, 97: 40-44.
- Büttow, V. M. 2005. **Sistematização dos bancos ativos de germoplasma da Embrapa Clima Temperado em um sistema gerenciador de banco de dados georreferenciado**. Monografia de Graduação, Universidade Federal de Pelotas, Brasil, 49pp.
- Cavalcanti Mata, M. E. R. M.; Rocha, M. do S.; Duarte, M. E. M. 2004. Teor de água limite para crioconservação de sementes de algodão arbóreo variedade 6M. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, 6 (2): 179-189.
- Chandel, K. P. S.; Chaudhury, R.; Radhamani, J.; Malik, S. K. 1995. Desiccation and freezing sensitivity in recalcitrant seed of tea, cocoa and jackfruit. **Annals of Botany**, 76 (1): 443-450.

- Coelho, R. R. P. 2006. **Protocolo de crioconservação de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L. raça Latifolium Hutch.) cultivares BRS 200 marrom e BRS verde**. Tese de Doutorado, Universidade Federal da Paraíba, Brasil, 89pp.
- Diniz, P. S. 1999. **Análise de diferentes métodos de crioconservação na preservação de sementes de milho (*Zea mays* L.)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, Brasil, 80pp.
- Engelmann, F.; Engels, J. M. M. 2002. Technologies and strategies for *ex situ* conservation. In: Engels, J. M. M.; Rao, V. R.; Brown, A. H. D. & Jackson, M. T. (Eds). **Managing Plant Genetic Diversity**. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, p.89-103.
- Goldfarb, M. 2008. **Crioconservação e sanidade de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Campina Grande, Brasil, 110pp.
- Gonzaga, T. W. C.; Cavalcanti Mata, M. E. R. M.; Silva, H.; Duarte, M. E. M. 2003. Crioconservação de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* Engl.) e baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, 5 (2): 145-154.
- González-Benito, M. E.; Carvalho, J. M. F. C.; Pérez, C. 1998. Effect of desiccation and cryopreservation on the germination of embryonic axes and seeds of cotton. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 33 (1): 17-20.
- Joker, D.; Jepsen, J. 2003. *Jatropha curcas* L. seed leaflet, **Humbleback**, 83 (2): 1-2.
- Medeiros, A. C. de S.; Czarneski, C. M.; Freitas, G. F. de. 1992. Crioconservação de aroeira (*Astronium urundeuva* Fr. All.). **Anais do 2º Congresso Nacional sobre Essências Nativas**, São Paulo, Brasil, p.544-547.
- Nunes, L. F. 2007. **Caracterização de frutos, sementes e plântulas e cultivo de embriões de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Brasil, 78pp.
- Rocha, M. do S. 2004. **Crioconservação e cultivo in vitro de sementes de algodão colorido**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Campina Grande, Brasil, 112pp.
- Santos, I. R. I. 2000. Crioconservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, 12 (Edição Especial): 70-84.
- Saturnino, H. M.; Pacheco, D. D.; Kakida, J.; Tominaga, N.; Gonçalves, N. P. 2005. Produção de oleaginosas para o biodiesel. **Informe Agropecuário**, 26 (229): 44-74.
- Severino, L. S.; Lima, R. de L. S.; Beltrão, N. E. de M. 2006. Germinação e crescimento inicial de plântulas de pinhão manso em função do peso da semente. **Embrapa Algodão, Comunicado Técnico**, 309: 3-4.
- Silva, F. de A. S. E. 2006. The ASSISTAT Software: Statistical assistance. **International Conference on Computers in Agriculture**, Cancun, México, p.294-298.
- Stanwood, P. C. 1980. Tolerance of crops seeds to cooling and storage in liquid nitrogen (-196°C). **Journal of Seed Technology**, 5 (1): 26-31.
- Sturshnoff, C.; Seufferheld, M. 1995. Cryopreservation of apple (*Malus species*) genetic resources. In: Bajaj, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry, Cryopreservation of Plant Germplasm I**. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Deutschland and USA, p.87-101.
- Touchell, D. H.; Dixon, K. W. 1994. Cryopreservation for seedbanking of Australian species. **Annals of Botany**, 74: 541-546.
- Tresena, N. de L. 2004. **Crioconservação de sementes de ipê amarelo (*Tatebuia chrysothrica* Mart. ex. DC.) Standl.) e de ipê rosa (*Tatebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Campina Grande, Brasil, 54pp.
- Vieira, M. T. S. 2001. Conservação de germoplasma na forma de sementes *in vitro* e crioconservação. **IIIº Simpósio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe**, Londrina, Brasil, p.30-32.
- Vieira, R. D.; Carvalho, N. M. 1994. **Teste de vigor em sementes**. Editora Afiliada, São Paulo, Brasil, 164pp.