

Brasília, DF
Novembro, 2002

Autores

**Antonietta Nassif
Salomão**

Eng^a. Florestal,
Pesquisadora, M.Sc.,
Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia,
Brasília - DF, E-mail:
antoniet@cenargen.embrapa.br

**Izulmé Rita Imaculada
Santos**

Bióloga, Pesquisadora,
PhD, Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia,
Brasília - DF, E-mail:
izulme@cenargen.embrapa.br

**Rosângela Caldas
Mundim**

Assistente de Operações,
Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia,
Brasília - DF, E-mail:
rosa@cenargen.embrapa.br



Estabelecimento de método para congelamento e descongelamento de sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vog.) Macbr (Caesalpinaceae)

Introdução

Técnicas de criopreservação têm sido utilizadas para sementes de inúmeras espécies herbáceas, arbustivas e arbóreas de região temperada (Pence, 1991; Iriando et al., 1992; Touchell & Dixon, 1993, 1994; Gonzalez-Benito et al., 1998). No entanto, para as espécies tropicais, é necessário estabelecer protocolos para que estas técnicas sejam adotadas rotineiramente.

O estabelecimento de protocolos para criopreservação de sementes está condicionado ao conhecimento de suas propriedades físicas e químicas e da determinação do conteúdo de umidade ideal, bem como das taxas apropriadas de congelamento e descongelamento (Stanwood & Roos, 1979; Engelmann, 2000). Tais fatores são espécie-específicos e requerem estudos e avaliações para cada espécie (Dickie & Smith, 1995; Potts & Lumpkin, 1997).

Há controvérsias quanto à velocidade de congelamento e descongelamento adequada para garantir a integridade do material quando exposto ao nitrogênio líquido. Stanwood & Bass (1981) sugerem que o congelamento rápido tende a promover um resfriamento mais uniforme da água subcelular e o descongelamento lento evita danos nos tecidos e células da semente. Em contraste, Dumet & Benson (2000) propõem que o congelamento rápido resulta em formação de cristais de gelo intracelulares, o que é letal para as células e os tecidos das sementes. Por outro lado, o congelamento lento resulta em danos ou morte celular, porque ocorre uma desidratação osmótica extrema, quando a água intracelular movimenta-se para fora da célula compensando a água congelada dos componentes extracelulares.

Objetivou-se neste trabalho, estabelecer o método para a criopreservação de sementes de *Apuleia leiocarpa*, avaliando o efeito das taxas de congelamento e descongelamento sobre a integridade germinativa das sementes.

Material e Métodos

Sementes de *Apuleia leiocarpa* com conteúdo de umidade inicial (testemunha) e após embebição por 24 h à temperatura de 25°C, foram acondicionadas em sacos aluminizados, com e sem vermiculita, na proporção de três vezes o volume de vermiculita para o volume de sementes. Foram utilizadas quatro repetições de dez sementes para os seguintes tratamentos:

1. congelamento e descongelamento da testemunha sem vermiculita;
2. congelamento e descongelamento da testemunha com vermiculita;
3. congelamento e descongelamento de sementes embebidas sem vermiculita;
4. congelamento e descongelamento de sementes embebidas com vermiculita.

A velocidade de congelamento (imersão direta em nitrogênio líquido) e descongelamento (à temperatura ambiente) foi mensurada com Thermocouple Delta OHM TP 956, inserido em cada recipiente dos tratamentos previamente descritos.

Antes e após cada tratamento, as sementes foram submetidas ao teste de germinação, à temperatura de incubação de 25°C. A contagem de sementes germinadas (plântulas normais) foi feita até o 32º dia após o início do teste.

O conteúdo de umidade inicial e após a embebição foi determinado pelo método de estufa, 105 ± 3°C por 24 h, e expresso como porcentagem média, de três repetições de cinco sementes cada, com base no peso fresco.

Os resultados de velocidade de congelamento e descongelamento e de germinação foram submetidos à análise de variância (ANOVA), $P = 5\%$.

Resultados

Sementes de *Apuleia leiocarpa* apresentaram conteúdo de umidade inicial de 5,3% ($\pm 0,40$) e após 24 h de embebição, a umidade foi de 5,4% ($\pm 0,70$). A inexpressiva absorção de água pelas sementes, deveu-se à dormência física causada pela impermeabilidade da testa à água.

Não houve diferença significativa entre as taxas de congelamento da testemunha com e sem vermiculita, 294,8°C.min.⁻¹ e 236,7°C.min.⁻¹, respectivamente (Fig. 1). Observou-se que as taxas de congelamento da testemunha (294,8°C . min.⁻¹) e das sementes embebidas (304,4°C.min.⁻¹), ambas sem vermiculita, tampouco diferiram significativamente (Fig. 1). A maior taxa de congelamento, 466,9°C.min.⁻¹, foi obtida para as sementes embebidas e congeladas com vermiculita (Fig. 1).

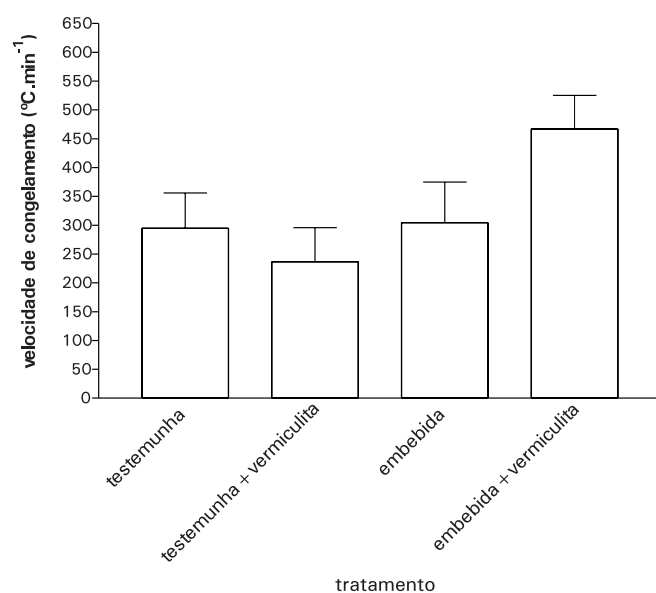


Fig. 1. Velocidade de congelamento em nitrogênio líquido de sementes de *Apuleia leiocarpa*, com conteúdo de umidade inicial e após 24 h de embebição

As taxas de descongelamento foram lentas em todos os tratamentos, 6°C.min.⁻¹ testemunha sem vermiculita, 6,8°C.min.⁻¹ testemunha com vermiculita, 7,5°C.min.⁻¹ sementes embebidas sem vermiculita e 8,3°C.min.⁻¹ com vermiculita (Fig. 2). Houve diferença significativa entre os valores obtidos para as testemunhas com e sem vermiculita e aqueles obtidos para as sementes embebidas com e sem vermiculita.

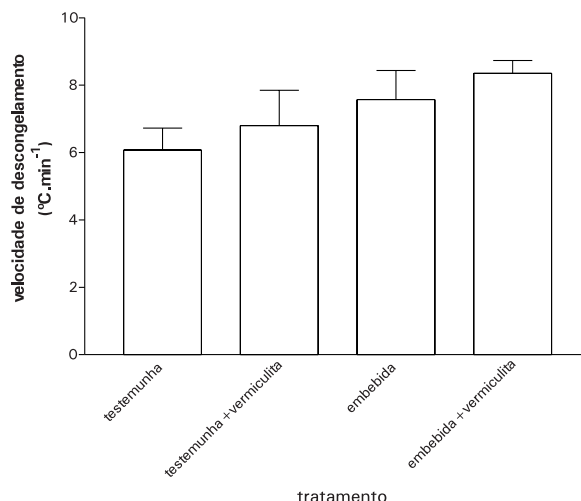


Fig.2. Velocidade de descongelamento em nitrogênio líquido de sementes de *Apuleia leiocarpa*, com conteúdo de umidade inicial e após 24 h de embebição

Constatou-se que a menor velocidade de congelamento ocorreu para a testemunha com vermiculita e a maior velocidade de descongelamento ocorreu para sementes embebidas com vermiculita. Aparentemente, a vermiculita não atuou como isolante térmico, nas condições de realização do experimento.

Tanto a testemunha quanto as sementes embebidas não expostas ao nitrogênio líquido apresentaram baixos valores de germinação, quais sejam 10% testemunha e 30% sementes embebidas (Fig. 3). O congelamento rápido e o descongelamento lento tiveram efeito favorável sobre a germinação das sementes, ainda que as sementes embebidas com vermiculita tenham atingido 80% de germinação. Todos os valores de germinação de sementes expostas ao nitrogênio líquido foram significativamente maiores que aqueles observados para as sementes não expostas à temperatura criogênica. Tais resultados confirmam observações feitas sobre a remoção de dormência física de sementes pela ação de nitrogênio líquido, seja induzindo rupturas ou seja formando uma rede de fissuras nas estruturas que envolvem o embrião (Busse, 1930; Brant et al, 1971).

Segundo os resultados obtidos, sementes de *Apuleia leiocarpa* podem ser preservadas à temperatura de -196°C, adotando-se congelamento rápido, taxas entre 236,7°C.min.⁻¹ e 304,4°C.min.⁻¹, e descongelamento lento, taxas entre 6°C.min.⁻¹ e 7,5°C.min.⁻¹.

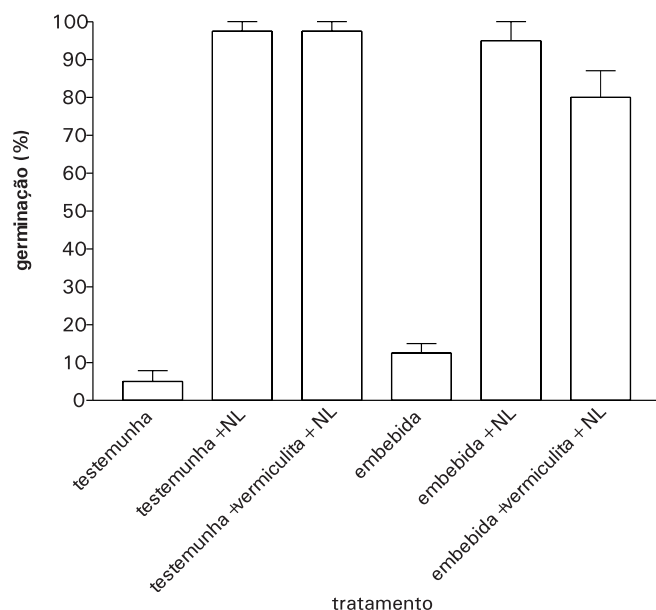


Fig. 3. Germinação de sementes de *Apuleia leiocarpa*, com conteúdo de umidade inicial e após 24 h de embebição

Referências Bibliográficas

- BRANT, R.E.; MCKEE, G.W.; CLEVELAND, R.W. Effect of chemical and physical treatment on hard seed of penngift crow-vetch. **Crop Science**, 11: 1 - 6. 1971.
- BUSSE, W.F. Effect of low temperatures on germination of impermeable seeds. **Botanical Gazette**, 89: 169 - 179. 1930.
- DICKIE, J.B.; SMITH, R.D. Observations on the survival of seeds of *Agathis* spp stored at low moisture contents and temperatures. **Seed Science Research**, 5: 5 - 14. 1995.
- 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, Tsukuba, Japan; International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy (JIRCAS/IPGRI). 2000. p. 43-56.
- ENGELMANN, F. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In: ENGELMANN F.; TAKAGI, H. (Ed.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm current research progress and application**. Japan International Research Center for Agricultural Science, Tsukuba, Japan; International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy (JIRCAS/IPGRI). 2000. p. 8 - 20.
- GONZALEZ-BENITO, M.E.; IRIONDO, J.M.; PÉREZ-GARCÍA, F. Seed cryopreservation: an alternative method for conservation of Spanish endemics. **Seed Science and Technology**, 26: 257 - 262. 1998.
- IRIONDO, J.M.; PÉREZ, C.; PÉREZ-GARCIA, F. Effect of seed storage in liquid nitrogen on germination of several crop and wild species. **Seed Science and Technology**, 20: 165 - 171. 1992.
- PENCE, V.C. Cryopreservation of seeds of Ohio native plants and related species. **Seed Science and Technology**, 19: 235 - 251. 1991.
- POTTS, S.E.; LUMPKIN, T.A. Cryopreservation of *Wasabia* spp seeds. **Cryo-Letters**, 18: 185 - 190. 1997.
- STANWOOD, P.C.; ROOS, E.E. Seed storage of several horticultural species in liquid nitrogen (-196°C). **HortScience**, 14: 628 - 530. 1979.
- STANWOOD, P. C.; BASS, L. N. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. **Seed Science and Technology**, 9: 423-237. 1981.
- TOUCHELL, D.H.; DIXON, K.W. Cryopreservation of seed of Western Australian native species. **Biodiversity Conservation**, 2: 594 - 602. 1993.
- TOUCHELL, D.H.; DIXON, K.W. Cryopreservation of seedbanking of Australian species. **Annals of Botany**, 74: 541 - 546. 1994.

Circular Técnica, 19

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) -
Brasília, DF. CEP 70.770-900 - Caixa Postal 02372
PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail: sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2002): 150 unidades

Comitê de publicações

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias
Secretário-Executivo: Miraci de Arruda Câmara Pontual
Membros: Antônio Costa Allem

Marcos Rodrigues de Faria

Marta Aguiar Sabo Mendes

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares Campos Carneiro

Expediente

Supervisor editorial: Miraci de Arruda Câmara Pontual

Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi

Editoração eletrônica: Alysson Messias da Silva