

Boletim de Pesquisa 1 **Desenvolvimento**

ISSN 1676 - 1340
Setembro, 2001

FOL 05422
2001
FL-05422

Relação da Tolerância de Sementes de Joá (*Zizyphus joazeiro*) à Exposição ao Nitrogênio Líquido

República Federativa do Brasil

Fernando Henrique Cardoso
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Marcus Vinicius Pratini de Moraes
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Márcio Fortes de Almeida
Presidente

Alberto Duque Portugal
Vice-Presidente

Dietrich Gerhard Quast
José Honório Accarini
Sérgio Fausto
Urbano Campos Ribeiral
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Alberto Duque Portugal
Diretor-Presidente

Dante Daniel Giacomelli Scolari
Bonifacio Hideyuki Nakasu
José Roberto Rodrigues Peres
Diretores-Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Luiz Antonio Barreto de Castro
Chefe-Geral

Arthur da Silva Mariante
Chefe-Adjunto de Administração

Bonifacio Peixoto Magalhães
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

José Manuel Cabral Sousa Dias
Chefe-Adjunto de Comunicação, Negócios e Apoio

Embrapa

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1676 - 1340

Setembro, 2001

EMBRAPA
GENGEN

**Boletim de Pesquisa
e Desenvolvimento 1**

**Avaliação da Tolerância de
Sementes de Joá (*Zizyphus
joazeiro*) à Exposição ao
Nitrogênio Líquido**

Antonieta Nassif Salomão

Brasília, DF
2001

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF

CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372

PABX: (61) 448-4600

Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Secretária-Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual

Membros: Antônio Costa Allem

Marcos Rodrigues de Faria

Marta Aguiar Sabo Mendes

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares Campos Carneiro

Suplentes: Edson Junqueira Leite

José Roberto de Alencar Moreira

Supervisor editorial: Miraci de Arruda Camara Pontual

Revisor de texto: Felisberto de Almeida e Miraci de A.C. Pontual

Normalização bibliográfica: Maria Iara Pereira Machado

Sérgio Souza Snatos

Tratamento de ilustrações: Alysson Messias da Silva

Editoração eletrônica: Alysson Messias da Silva

1ª edição

1ª impressão (2001): tiragem 150 exemplares.

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

SALOMÃO, A. N. **Avaliação da tolerância de sementes de Joá (*Zizyphus joazeiro*) à exposição ao nitrogênio líquido.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 16p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 1)

ISSN 1676 - 1340

1. *Zizyphus joazeiro* - semente 2. Joá - semente 3. Conservação biológica 4. Conversação de germoplasma I. Título II. Série

CDD 583.279

© Embrapa 2001

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	8
Material	8
Exposição ao nitrogênio líquido	8
Teste de germinação	8
Determinação do padrão de absorção de água durante a embebição ...	9
Análise estatística	9
Resultados e Discussão	9
Referências Bibliográficas	14

Avaliação da Tolerância de Sementes de Joá (*Zizyphus joazeiro*) à Exposição ao Nitrogênio Líquido

Antonieta Nassif Salomão¹

Resumo

A tolerância de sementes - endocarpos - de *Zizyphus joazeiro* (Mart.) à temperatura subzero de -196°C foi avaliada. As sementes foram expostas diretamente ao nitrogênio líquido por 24 h e descongeladas lentamente à temperatura ambiente. As sementes não se mostraram sensíveis ao nitrogênio líquido e apresentaram maiores percentagem e velocidade de germinação que a testemunha. Os resultados sugerem que as sementes são tolerantes ao congelamento e que a criopreservação pode ser uma alternativa para a conservação de germoplasma da espécie.

¹Eng^a. Florestal, Pesquisadora MsB., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.
E-mail: antoniet@cenargen.embrapa.br

Evaluation of Joá (*Zizyphus Joazeiro*) Seeds Tolerance to Liquid Nitrogen Exposure

Abstract

Zizyphus joazeiro (Mart.) seeds – endocarps - tolerance to subzero temperature at -196°C was investigated. Seeds were directly exposed to liquid nitrogen for 24 hours and thawed slowly at room temperature. Seeds did not reveal sensitivity to liquid Nitrogen and showed higher germination percentage and germination rate than the control. The results suggest that the seeds are freezing-tolerant and cryopreservation may be an alternative for the species germplasm conservation.

Introdução

Zizyphus joazeiro (Mart.) - Rhamnaceae - espécie arbórea nativa da região semi-árida, é utilizada para fim farmacológico, alimentício e forrageiro (Matos, 1981). A espécie possui semente tolerante à desidratação, cuja germinação é intermitente e dependente das temperaturas alternadas de 20-30°C, como observado para as sementes de outras espécies do gênero *Zizyphus* (Murthy & Reddy, 1990; Salomão et al., 1991).

As condições de um banco de germoplasma convencional, onde as sementes ortodoxas são armazenadas com baixo teor de umidade, em recipientes hermeticamente fechados, à temperatura de -18°C, permitem que tanto a respiração, quanto a deterioração dessa categoria de sementes sejam mantidas em níveis aceitáveis (Hukill, 1963). A criopreservação às temperaturas de -196°C (nitrogênio líquido) ou de -156°C (vapor de nitrogênio líquido) tem sido indicada como um método mais eficiente para a conservação de sementes ortodoxas. Isto porque, sob condições criogênicas, o metabolismo basal da semente é cessado e a estabilidade genética é assegurada, favorecendo a manutenção da longevidade e da integridade do germoplasma durante a conservação (Stanwood, 1984).

Tem-se observado, no entanto, que o processo de congelamento e descongelamento de material biológico pode resultar em mudanças em suas características morfofisiológicas (Breda et al., 1992). Em sementes ortodoxas, o efeito deletério desse processo está diretamente associado ao conteúdo de água e às propriedades físico-químicas das sementes, bem como à velocidade de congelamento e descongelamento do material (Stanwood & Bass, 1981). A tolerância à dessecação não confere, necessariamente às sementes, tolerância ao congelamento em nitrogênio líquido (Dussert et al., 1998). Se sementes de várias espécies hortícolas e agrícolas, tolerantes à desidratação, segundo padrões recomendados para a criopreservação (Stanwood, 1985), podem ser rotineiramente armazenadas a -196°C (Styles et al., 1982), sementes de *Coffea liberica*, *Lactuca sativa* e *Sesamum indicum* respondem favoravelmente à exposição a -196°C, quando seus níveis de umidade estão acima daqueles padrões recomendados (Normah & Vengadasalam, 1992; Juntilla & Stushnoff, 1977; Stanwood, 1987). Portanto, o conhecimento das características da semente, assim como dos fatores que podem comprometer sua sobrevivência

em temperatura criogênica é fundamental na adoção da criopreservação para sua conservação a longo prazo.

O objetivo desse estudo foi avaliar a tolerância de sementes de *Z. joazeiro* à exposição ao nitrogênio líquido.

Material e Métodos

Material

Sementes - endocarpos - de *Z. joazeiro*, de frutos coletados em Petrolina, PE, foram despulpadas seguindo-se sucessivas lavagens em água corrente e secagem à temperatura ambiente (25°C), por dois dias. As sementes foram acondicionadas em sacos de plástico e armazenadas à temperatura ambiente (25°C), por sete meses. Após esse período, o conteúdo de umidade das sementes foi determinado a $105 \pm 3^\circ\text{C} / 24 \text{ h}$, com duas repetições de 15 sementes. Os resultados foram expressos com base no peso fresco.

Exposição ao nitrogênio líquido

Dois recipientes criogênicos, contendo 200 sementes cada, foram imersos diretamente no nitrogênio líquido. Após 24 h de exposição a -196°C , as sementes foram retiradas e descongeladas à temperatura ambiente, por 3 h.

Teste de germinação

Testes de germinação - testemunha e sementes submetidas ao congelamento foram conduzidos, com quatro repetições de 100 sementes, em papel toalha e à temperatura de incubação de $20-30^\circ\text{C}$ (16h / 8h), por 30 dias. O critério adotado para considerar a semente germinada foi a curvatura geotrópica positiva da radícula (comprimento de 1 cm).

O tempo médio de germinação e a velocidade de germinação foram calculados segundo Labouriau & Pacheco (1979), onde:

Tempo médio de germinação:

$t \text{ (dias)} = \sum (n_i \cdot t_i) / \sum n_i$ ($\sum n_i$ = total de sementes germinadas e t_i = média ponderada dos tempos de germinação $t_{i-1} - t_i$)

Velocidade de germinação:

$$\nabla \text{ (dias}^{-1}\text{)} = 1 / t$$

Variância da velocidade de germinação :

$$S^2 \nabla \text{ (dias}^{-2}\text{)} = (\nabla)^4 \cdot S_t^2 = \sum n_i (t_{i-1} - t_i)^2 / (-1 + \sum n_i)$$

Determinação do padrão de absorção de água durante a embebição

Curvas de embebição foram determinadas pesando-se as sementes durante as seis primeiras horas após o semeio, seguindo-se com pesagens diárias, até a protrusão radicular.

Análise estatística

Os resultados de germinação foram submetidos à análise de variância (ANOVA).

Resultados e Discussão

O conteúdo de água da semente é um fator preponderante para o sucesso do congelamento. Esse nível é variável entre as espécies e pode-lhes conferir maior ou menor susceptibilidade aos danos resultantes da exposição ao nitrogênio líquido (Becwar et al., 1983). A sobrevivência de sementes de *Z. joazeiro*, após a exposição a -196°C , não foi comprometida por seu conteúdo de umidade de 7,7%. O efeito favorável do nitrogênio líquido sobre as sementes de *Z. joazeiro* foi evidenciado ao se comparar percentagens, tempos médios e velocidades de germinação apresentados pelas sementes submetidas ao congelamento e por aquelas não tratadas (Tabela 1 e Fig. 1). Efeito similar do nitrogênio líquido foi observado em sementes de *Solanum* spp., com cerca de 6% de umidade, e em sementes de *Amburana cearensis*, *Aspidosperma discolor*, *A. parvifolium*, *Astronium fraxinifolium*, *Jacaranda cuspidifolium*, *Magonia pubescens*, *Tabebuia caraiba*, *T. impetiginosa* e *T. serratifolia*, com conteúdos de umidade variando de 5,0 a 8,5%. Essas sementes sobreviveram à exposição à temperatura subzero, sem comprometimento do tempo médio e da percentagem final de germinação (Towill, 1982; Salomão & Mundim, 1997).

Tabela 1. Percentagem e velocidade de germinação de sementes de *Zizyphus joazeiro*

Tratamento	Σn_i	G% ⁽¹⁾	Velocidade de Germinação			
			t (dias)	∇ (d ⁻¹)	S ² ∇ (d ⁻²)	
Testemunha	324	81 B ⁽²⁾	16,14	0,062	31,36	
-196°C	370	92 A	13,41	0,075	17,70	

⁽¹⁾ percentagem final de germinação
⁽²⁾ significância P = 0,5%

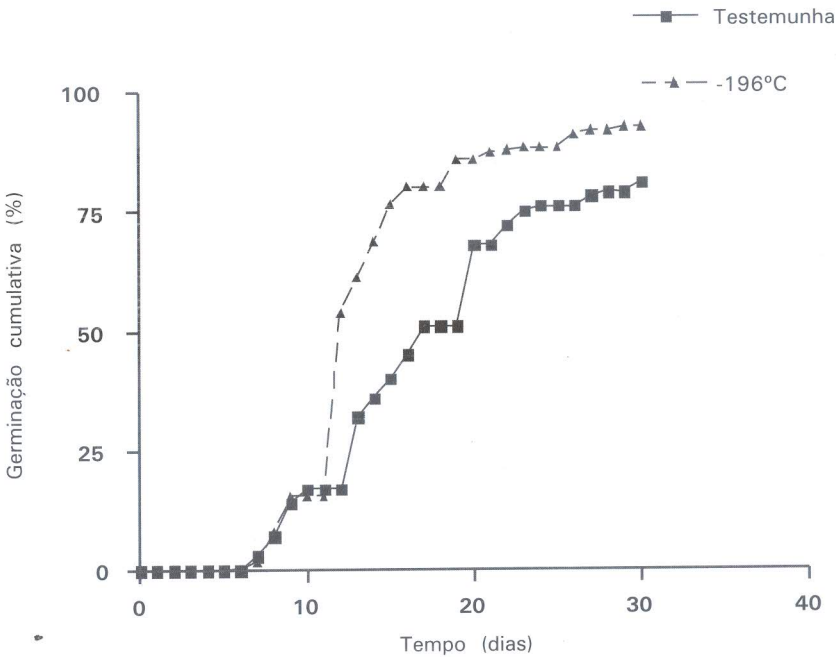


Fig. 1. Percentagens de germinação cumulativa de sementes de *Zizyphus joazeiro*.

A germinabilidade das sementes de *Z. joazeiro* não foi afetada pelo congelamento rápido. Tanto as sementes submetidas ao congelamento, quanto aquelas não tratadas apresentaram o mesmo padrão de produção e crescimento radicular. Se para as sementes dessa espécie o congelamento rápido não comprometeu sua germinabilidade, provavelmente, o descongelamento lento foi decisivo para a manutenção da germinabilidade. O efeito positivo do descongelamento lento foi relatado para sementes ortodoxas de outras espécies. Sementes de *Setaria lutescens* aumentaram a percentagem de germinação de 40 para 70% ao serem descongeladas lentamente (Jordan et al., 1982). Sementes de *Manihot esculenta* tiveram alto índice de sobrevivência quanto submetidas ao descongelamento lento, independente da velocidade de congelamento (Marin et al., 1990). Sementes de *Manihot glaziovii* atingiram maior percentagem de germinação após descongelamento lento, precedido por congelamento rápido (Salomão et al., 1997a).

As curvas de embebição mostraram um padrão trifásico, tanto para as sementes submetidas ao congelamento, quanto para a testemunha, apesar da diferença de absorção de água entre as sementes tratadas e não tratadas (Fig. 2 a e b). Sementes tratadas absorveram água mais lentamente durante as duas primeiras fases de embebição. O aumento de absorção de água deu-se a partir de 96 h de embebição e a protrusão radicular ocorreu 140 h após o semeio. Essa lenta absorção de água durante as fases iniciais poderia ser atribuída à desorganização mecânica das estruturas do endocarpo, devido ao estresse térmico. Nesse caso, o endocarpo teria protegido a semente de danos físicos e mecânicos decorrentes do estresse térmico. A função protetora do endocarpo foi evidenciada em sementes de *Coffea liberica*. A maior taxa de sobrevivência dessas sementes foi obtida quando expostas ao nitrogênio líquido com o endocarpo (Normah & Vengadasalam, 1992). Tem sido sugerido que, para sementes dessecadas, a rápida reidratação pode resultar em injúrias. Entretanto, é durante o processo de reidratação que ocorrem os reparos dos danos físicos e a retomada da atividade metabólica das sementes (Sherwin & Farrant, 1996). Mecanismos de reparo, possivelmente, ocorreram durante as etapas subsequentes de embebição, os quais propiciaram a expressão dos efeitos benéficos do congelamento sobre as sementes de *Z. joazeiro*. Durante o congelamento de sementes de *Setaria lutescens*, formaram-se fissuras na testa impermeável à água, o que favoreceu a embebição e, conseqüentemente, a germinação (Jordan et al., 1982). Resultados similares foram observados em sementes de *Nicotiana occidentales* e de *Schinopsis brasiliensis*, as quais apresentaram maior velocidade de germinação após o armazenamento em nitrogênio líquido (Touchell & Dixon, 1993; Salomão et al., 1997 b). É possível que o congelamento tenha induzido o amolecimento do rígido endocarpo de *Z. joazeiro* ou a formação de fissuras em sua superfície, o que promoveu a embebição e, por conseguinte, a germinação. Os resultados obtidos nesse estudo indicam que sementes de *Z. joazeiro* são tolerantes e respondem favoravelmente à exposição ao nitrogênio líquido. Esses resultados permitem considerar a criopreservação como uma alternativa promissora para a conservação a longo prazo de germoplasma da espécie.

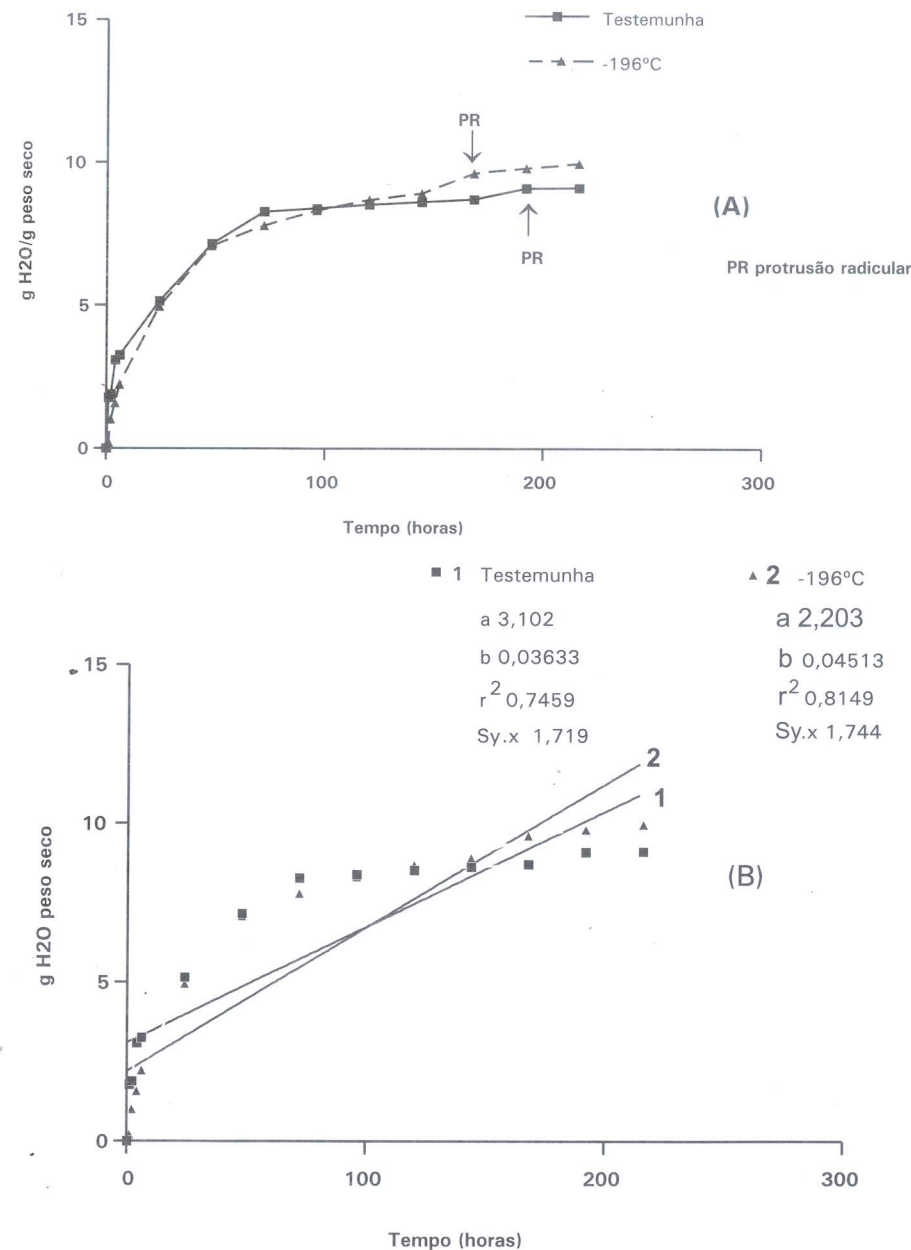


Fig. 2. Curvas de embebição de sementes de *Zizyphus joazeiro* curvas normais (A) e regressão linear (B).

Referências Bibliográficas

BECWAR, M. R.; STANWOOD, P. C.; LEONHARDT, K. W. Dehydration effects of freezing characteristics and survival in liquid nitrogen of desiccation-tolerant and desiccation sensitive seeds. **Journal of American Horticulture Society**, v.108, n.4, p.613-618, 1983.

BREDA, M.; VITOLO, M.; DURANTI, M. A.; PITOMBO, R. N. M. Effect of freezing-thawing on invertase activity. **Cryobiology**, v.29, n.2, p.281-290, 1992.

DUSSERT, S.; CHABRILLANGE, N.; ENGELMANN, F.; ANTHONY, F.; LOUARN, J.; HAMON, S. Cryopreservation of seeds of four coffee species (*Coffea arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. **Seed Science Research**, v.8, n.1, p.9-15, 1998.

HUKILL, W. V. Storage of seeds. **Proceeding of the International Seed Testing Association**, v.28, n.4, p.871-882, 1963.

JORDAN, J. L.; JORDAN, L. S.; JORDAN, C. M. Effects of freezing to -196°C and thawing on *Setaria lutescens* seeds. **Cryobiology**, v.19, n.4, p.435-442, 1982.

JUNTILLA, O.; STUSHNOFF, C. Freezing avoidance by deep supercooling in hydrated lettuce seeds. **Nature**, v.269, n.22, p.325-327, 1977.

LABOURIAU, L. G.; PACHECO, A. A. Isothermal germination rates in seeds of *Dolichos biflorus* L. **Boletín de la Sociedad Venezolana de Ciencias Naturales**, v.136, n.34, p.73-112, 1979.

MARIN, M. L.; MAFLA, G.; ROCA, W. M.; WITHERS, L. A. Cryopreservation of cassava zygotic embryos and whole seeds in liquid Nitrogen. **Cryo-Letters**, v.11, n.4, p.257-264, 1990.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**. Fortaleza: UFC, 1981. 80p.

MURTHY, B. N. S.; REDDY, Y. N. Temperature dependence of seed germination and seedling growth in ber (*Zizyphus mauritiana* Lam.) and their modification by pre-sowing treatments. **Seed Science and Technology**, v.18, n.3, p.621-627, 1990.

NORMAH, M. M.; VENGADASALAM, M. Effects of moisture content on cryopreservation of *Coffea* and *Vigna* seeds and embryos. **Cryo-Letters**, v.13, n.3, p.199-208, 1992.

SALOMÃO, A. N.; CUNHA, R da.; EIRA, M. T. S. Observações preliminares sobre a germinação de sementes de espécies da Caatinga. **Informativo ABRATES**, v.1, n.4, p.76, 1991. Número especial.

SALOMÃO, A. N.; MUNDIM, R.C. Efeito de diferentes graus de umidade na viabilidade de sementes de 11 espécies arbóreas durante a criopreservação. **Informativo ABRATES**, v.7, n.1/2, p.224, 1997. Número especial.

SALOMÃO, A. N.; MUNDIM, R.C.; FAIAD, M.G.R. Tratamentos para superar a dormência de sementes de maniçoba (*Manihot glaziovii* Muell. Arg.) Euphorbiaceae. **Informativo ABRATES**, v.7, n.1/2, p.120, 1997a. Número especial.

SALOMÃO, A. N.; MUNDIM, R.C.; ROCHA, L.M.T. Métodos para promover a germinação de sementes de braúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.) Anacardiaceae. **Informativo ABRATES**, v.7, n.1/2, p.119, 1997b. Número especial.

SHERWIN, H. W.; FARRANT, J. M. Differences in rehydration of three desiccation-tolerant Angiosperm species. **Annals of Botany**, v.78, n.6, p.703-710, 1996.

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

STANWOOD, P. C. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: KARTHA, K. K. (Ed.). **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton: CRC Press, 1985. p.199-226.

STANWOOD, P. C. Survival of sesame seeds at the temperature (-196°C) of liquid Nitrogen. **Crop Science**, v.27, n.2, p.327-331, 1987.

STANWOOD, P. C.; BASS, L. N. Seed germplasm preservation using liquid Nitrogen. **Seed Science and Technology**, v.9, n.2, p.433-437, 1981.

STYLES, E. D.; BURGESS, J. M.; MASON, C.; HUBER, B. M. Storage of seed in liquid Nitrogen. **Cryobiology**, v.19, n.2, p.195-199, 1982.

TOUCHELL, D. H. ; DIXON, K. W. Cryopreservation for seed banking of Australian species. In: SYMPOSIUM ON LOW TEMPERATURE ASPECTS OF SEED CONSERVATION, 1993, [Resumo...] [S. l.: s.n.], 1993. p.22.

TOWILL, L. E. Low temperature (-196°C) storage of true seed from the tuber-bearing *Solanum* species. **American Potato Journal**, v.59, n.4, p.141-147, 1982.



*Recursos Genéticos
e Biotecnologia*

Avaliacao da tolerancia de ...

2001

FL-05422



CENARGEN- 19329-1