

Brasília, DF  
Setembro, 2003

## Autores

Maria Magaly V.S.  
WetzelEngenheira agrônoma, PhD,  
Pesquisadora da Embrapa  
Recursos Genéticos e  
Biotecnologia

Raimunda Barreira Reis

Geógrafa, Técnica de Nível  
Superior da Embrapa Recursos  
Genéticos e Biotecnologia

Kennya M. Ramos

Bióloga, Estagiário

## Metodologia para criopreservação de sementes de espécies florestais nativas

### RESUMO

As técnicas de criopreservação de sementes têm sido muito utilizadas para a conservação a longo prazo de sementes em bancos de germoplasma. Ultimamente, houve um grande avanço das pesquisas em criopreservação de sementes resultando em protocolos de conservação para cerca de 100 espécies. Entretanto estas pesquisas tem sido desenvolvidas com sementes de espécies de clima temperado e frio e pouco tem sido realizado com as espécies de sementes de clima subtropical e tropical. O objetivo deste trabalho foi estudar o comportamento das sementes de espécies florestais nativas brasileiras na conservação em nitrogênio líquido. Este trabalho foi executado no Laboratório de Fisiologia de Sementes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As amostras de sementes foram coletadas no Cerrado. Foram estudadas as sementes de 13 espécies pertencentes a 7 famílias botânicas relacionadas a saber: *Aegiphila lhotzkiana* Cham. (Verbenaceae); *Albizia lebeck* (L.) Benth. (L.Mimosoideae); *Anadenanthera macrocarpa* Benth. (L.Mimosoideae); *Bauhinia* sp. (L.Caesalpinoideae); *Cassia ferruginea* (Schrader.) Schrader Ex DC. (L. Caesalpinoideae); *Chorisia speciosa* St.Hil. (Bombacaceae); *Hymenae stignocarpa* Mart. ex Hayne (L.Caesalpinoideae); *Mimosa setosa* Benth (L.Mimosoideae); *Platypodium elegans* Vog. (L.Papilionoideae); *Qualea parviflora* Mart. Warm. (Vochysiaceae); *Roupala montana* Aubl. (Proteaceae); *Sclerolobium aureum* (Tul.) Benth. (L.Caesalpinoideae); *Tabebuia umbellata* (Sond.) Sandw. (Bignoniaceae). A umidade inicial das sementes variou de 5,41% a 25,17%, apresentando uma média de 10,89 % e após secagem a variação foi de 3,46% a 7,54%, ficando a média em 5,93%. As sementes apresentaram uma média inicial da germinação de 64,92%, e após o período de congelamento a média foi de 62,23%. Os resultados indicaram para as espécies estudadas que as sementes secas resistiram a temperatura de -196°C, sugerindo que esta técnica poderá ser usada para a conservação das espécies florestais nativas em bancos de germoplasma.

### INTRODUÇÃO

O Brasil, com uma extensa superfície de terras contínuas dispõe de diferentes ecossistemas sendo considerado um dos países de maior diversidade biológica do globo (UNEP, 1992; Brasil, 2002). Em geral, os recursos naturais do País tem sido pouco estudados, esta situação indica a necessidade de estudos que visem o melhor conhecimento e uso desta diversidade biológica e conseqüentemente, o estabelecimento de estratégias de conservação em função da destruição dos habitats naturais pelo homem através das queimadas, poluição das águas, expansão das áreas agrícolas e das áreas urbanas (Dias, 1994).

A semente é a forma pela qual a planta sobrevive o máximo de tempo com o mínimo de atividade fisiológica. Na conservação de sementes, deve-se prestar atenção às características fisiológicas que afetam a longevidade de cada espécie quando submetidas a baixos níveis de umidade e a temperaturas abaixo de zero. Segundo Roberts (1973) as sementes são classificadas como ortodoxas quando são capazes de manter a sua viabilidade após serem desidratadas e expostas a baixas temperaturas e são recalcitrantes quando não suportam desidratação e baixas temperaturas de armazenamento. Ultimamente surgiu através de novos estudos o comportamento das sementes "intermediárias", ou seja, que são sensíveis ou a desidratação ou a temperaturas baixas (Ellis, 1990).

As técnicas de criopreservação de sementes têm sido muito utilizadas para a conservação a longo prazo de sementes em bancos de germoplasma. Ultimamente, houve um grande avanço das pesquisas em criopreservação de sementes resultando em protocolos de conservação para cerca de 100 espécies. Entretanto estas pesquisas tem sido desenvolvidas com

sementes de espécies de clima temperado e frio e pouco tem sido realizado com as espécies de sementes de clima subtropical e tropical. Por outro lado, o avanço da agricultura no Brasil tem causado uma grande perda das espécies florestais nativas. A criopreservação de sementes pode ser uma forma de conservar a biodiversidade das espécies florestais das regiões subtropicais e tropicais do país.

Os estudos de armazenamento de sementes provaram que vários fatores influenciam no comportamento das sementes durante o armazenamento, tais como: a qualidade fisiológica inicial das sementes (viabilidade e vigor), o teor de umidade, a temperatura, condições da secagem, beneficiamento inapropriado, umidade relativa do ar, colheita imprópria, entre outros (Bewley & Black, 1984).

Durante a conservação, o conteúdo de umidade das sementes é um dos fatores que mais influencia a longevidade, e a garantia de um armazenamento seguro está relacionada com a desidratação (Harrington, 1972). Portanto, o tempo de vida de uma semente ortodoxa é função, dentre outros fatores, do conteúdo de umidade da semente e da temperatura de armazenamento (Bewley & Black, 1984).

A secagem das sementes é um dos fatores que interagem no prolongamento de sua vida. Durante o preparo das sementes para o armazenamento, as mesmas devem ser desidratadas até atingir um nível de umidade em torno de 3 a 7%, dependendo da espécie. A velocidade de secagem das sementes depende do tempo, temperatura e umidade relativa do ar, bem como das características intrínsecas da semente, tais como teor de água inicial, composição química, tamanho e área superficial (Carvalho e Nakagawa, 2000). Uma vez secas, as sementes são embaladas em sacos aluminizados e impermeáveis, para evitar que absorvam umidade e armazenadas em câmaras frias (IPGRI, 1994; Faiad, 1998).

A criopreservação compreende a conservação de material biológico a temperaturas ultra-baixas, em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , ou em sua fase de vapor ao redor de  $-150^{\circ}\text{C}$ . Às temperaturas ultra-baixas do nitrogênio líquido o metabolismo celular e todos os processos bioquímicos são significativamente reduzidos e a deterioração biológica é virtualmente paralisada (Kantha, 1985) e como consequência quase não ocorre deterioração biológica do material durante o armazenamento. Esta técnica tem sido recomendada para a conservação de sementes por longos períodos de tempo (Stanwood, 1984; Stanwood & Bass, 1978). O aumento na longevidade da semente reduziria a frequência das atividades de multiplicação, diminuindo o risco de contaminação e modificações na composição genética do acesso original (Stanwood & Roos, 1979). Stanwood (1985) indica que sementes de 155 espécies

agrícolas sobreviveram ao congelamento em nitrogênio líquido.

Resultados obtidos após congelamento em NL de sementes de espécies florestais indicam que as de aroeira (*Astronium urundeuva*) (Medeiros et al., 1992) e joazeiro (*Ziziphus joazeiro*) (Salomão, 1995) podem ser criopreservadas.

Estudos devem ser conduzidos no processo de desidratação, uma vez que o conteúdo de umidade é o mais crítico fator relacionado com a criopreservação. Existe um limite máximo de umidade para o congelamento, acima do qual ocorre a redução da viabilidade da semente durante congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido (Stanwood, 1985).

O objetivo deste trabalho foi estudar o comportamento da viabilidade das sementes das espécies florestais subtropicais e tropicais nativas na imersão em nitrogênio líquido visando a sua conservação a longo prazo.

## MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de sementes de 13 espécies florestais pertencentes a 7 famílias foram colhidas no bioma Cerrado entretanto nem todas são nativas deste bioma. Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Fisiologia de Sementes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A lista das espécies das sementes, suas famílias botânicas e o número de amostras trabalhadas encontra-se na Tabela 1.

Todas as amostras das sementes foram fumigadas logo após a coleta. Foram limpas de impurezas (sementes quebradas e outros materiais), beneficiadas (retiradas do fruto) e homogeneizadas visando a sua uniformização. O conteúdo de umidade das amostras foi avaliado de acordo com as Regras de Análise de Sementes - MAPA, (Brasil, 1992), ou seja, duas repetições são colocadas em estufa a  $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$  por 24 horas e o peso das sementes é avaliado antes e depois deste período. O número de sementes usado neste teste variou de acordo com o tamanho das sementes das espécies.

As Regras de Análise de Semente - MAPA ainda não têm métodos específicos para estas espécies estudadas, portanto, todas as sementes das espécies foram avaliadas da mesma forma ou seja, colocadas em papel toalha umedecido à temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  constantes. O número de sementes usadas para a avaliação da viabilidade dependeu do número de sementes de cada amostra, entretanto sempre com 2 ou 4 repetições. Sementes com tegumento impermeável, como é o caso da *Hymenaea*, e de outras leguminosas foram escarificadas manualmente antes da germinação. Foram consideradas viáveis as sementes

**Tabela 1.** Lista das espécies florestais, família e número de amostras trabalhadas

Espécie	Família	n.º amostras
<i>Aegiphila lhotzkiana</i> Cham.	Verbenaceae	1
<i>Albizia lebbbeck</i> (L.) Benth.	L.Mimosoideae	1
<i>Anadenanthera macrocarpa</i> Benth.	L.Mimosoideae	3
<i>Bauhinia</i> sp.	L.Caesalpinoideae	1
<i>Cassia ferruginea</i> (Schrader.) Schrader Ex DC.	L.Caesalpinoideae	1
<i>Chorisia speciosa</i> St.Hil.	Bombacaceae	4
<i>Hymenae stignocarpa</i> Mart. Ex Hayne	L.Caesalpinoideae	2
<i>Mimosa setosa</i> Benth	L.Mimosoideae	3
<i>Platypodium elegans</i> Vog.	L.Papilionoideae	1
<i>Qualea parviflora</i> Mart. Warm.	Vochysiaceae	1
<i>Roupala montana</i> Aubl. .	Proteaceae	1
<i>Sclerolobium aureum</i> (Tul.) Benth.	L.Caesalpinoideae	1
<i>Tabebuia umbellata</i> (Sond.) Sandw.	Bignoniaceae	2

que emitiram radícula e parte aérea. A duração do teste variou de acordo com a espécie. Sempre foi aguardado o desenvolvimento completo das plântulas.

Após as avaliações iniciais, as amostras de sementes foram embaladas em sacos de papel tipo Kraft e colocadas em câmara de secagem regulada nas condições de  $20 \pm 3^\circ\text{C}$  e  $12 \pm 3\%$  de umidade relativa. Após 15 dias, as amostras foram submetidas, novamente a determinação do grau de umidade e a um novo teste de germinação para avaliação das sementes quanto a resistência a desidratação. As amostras de sementes que não foram afetadas pela desidratação foram embaladas em sacos aluminizados (trifolheadas: polietileno-alumínio-polietileno) e fechados hermeticamente com selagem a calor e imersas em tanques contendo nitrogênio líquido por sete dias. Após esse período as amostras de sementes foram retiradas e descongeladas a temperatura ambiente e novamente submetidas ao teste de germinação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados comparativos para cada espécie. A umidade inicial das sementes variou de 5,41% a 25,17%, apresentando uma média de 10,89% e após secagem a variação foi de 3,46% a 7,54%, ficando a média em 5,93%. As sementes apresentaram uma média inicial da germinação de 64,92%, e após o período de congelamento a média foi de 62,23%.

As sementes de *Aegiphila* apresentaram germinação de apenas 30% entretanto observa-se que a imersão no nitrogênio líquido não afetou a germinação. Wetzel (1997) trabalhando com as sementes desta espécie observou que

os índices germinativos eram, no máximo, de 50%, talvez indicando ser uma característica de espécie. As sementes de *Albizia* foram escarificadas por terem o tegumento impermeável, este fato pode ter contribuído para o decréscimo da percentagem da germinação após a imersão no nitrogênio líquido. As sementes das espécies *Anadenanthera*, *Bauhinia*, *Hymenae* e *Mimosa*, todas da família de Leguminosas, apresentaram (foram submetidas a escarificação mecânica) um ligeiro aumento de germinação após a imersão. As sementes de *Cassia*, *Platypodium*, *Sclerolobium* e *Roupala* apresentaram um decréscimo de germinação após a imersão no nitrogênio líquido requerendo outros estudos e um maior número de amostras para se identificar a causa do decréscimo, que pode estar na amostra coletada de forma inapropriada e a outras causas (Bewley & Black, 1984). As sementes de *Chorisia* parecem não ter sido afetadas pela temperatura de  $-196^\circ\text{C}$ . podendo serem conservadas em tanques de nitrogênio líquido.

As sementes de *Qualea parviflora* embora contendo, inicialmente, teor de umidade das sementes que pode ser considerado elevado (25,17%), após secagem 8,46% mesmo assim a temperatura de  $-196^\circ\text{C}$  não afetou a sua alta germinação, podendo ser conservada a longo prazo em criotânques. As sementes da espécie de *Tabebuia* apresentaram um aumento de germinação, sugerindo que podem ser conservadas nestas condições. Diversas podem ser as causas das sementes das espécies estudadas que não apresentaram altas porcentagens de germinação iniciais, o que pode ser atribuído a diversos fatores como altos índices de contaminação fúngica (sementes coletadas no chão), desuniformidade de maturação, ausência de embrião, coleta de sementes imaturas, ataques de insetos, etc. Verifica-se porém, que estas espécies resistiram a imersão em nitrogênio líquido, embora algumas requeiram mais estudos.

**Tabela 2.** Sementes de espécies florestais, seu grau de umidade e porcentagem de Germinação: inicial, após secagem e após nitrogênio líquido.

Espécie	Umidade (%)		Germinação (%)	
	Inicial	Secas	Inicial	Após NL
<i>Aegiphila lhotzkiana</i> Cham.	8,21	4,58	30	35
<i>Albizia lebeck</i> (L.) Benth	9,2	6,07	65	50
<i>Anadenanthera macrocarpa</i> Benth	7,42	5,04	43	58
<i>Bauhinia</i> sp.	13,78	6,89	90	95
<i>Cassia ferruginea</i> (Schrader.) Schrader Ex DC.	10,96	6,45	90	35
<i>Chorisia speciosa</i> St.Hil	7,46	5,75	55	76
<i>Hymenae stignocarpa</i> Mart. Ex Hayne	10,46	5,04	35	40
<i>Mimosa setosa</i> Benth	5,41	3,46	70	95
<i>Platypodium elegans</i> Vog.	12,46	5,43	40	35
<i>Qualea parviflora</i> Mart. Warm	25,17	8,46	100	100
<i>Roupala montana</i> Aubl. .	12,82	7,54	100	65
<i>Sclerobium aureum</i> (Tul.) Benth	9,3	6,45	60	50
<i>Tabebuia umbellata</i> (Sond.) Sandw	8,97	6	66	75

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem a possibilidade da conservação ex-situ das sementes florestais nativas de clima tropical e subtropical em nitrogênio líquido. A criopreservação vem comprovando sua eficiência na conservação a longo prazo para a maioria das espécies tolerantes à dessecação sugerindo ser uma forma de conservação da diversidade biológica do País.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination.** New York: Plenum Press, 1984. 445 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes.** Brasília: MARA/SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Diversidade brasileira: avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade brasileira.** Brasília: MMA-SBF, 2002. 404 p.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção.** 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.
- DIAS, B. F. de S. Conservação da natureza no cerrado brasileiro. In: PINTO, M.N. (Org.). **Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas.** Brasília: Ed. Universidade de Brasília: SEMATEC, 1994. p. 607-646.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behavior. I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 41, p. 1167-1174, 1990.
- FAIAD, M. G. R.; SALOMÃO, A. N.; FERREIRA, F. R. GONDIM, M. T. P; WETZEL, M. M. V. S.; MENDES, R. A. GOES, M. de. **Manual de procedimentos para conservação de germoplasma semente a longo prazo na Embrapa.** Brasília: Embrapa, 1998. 31p.
- HARRINGTON, J. F. Seed storage and longevity. In: KOSLOWSKI, T. T. (Ed.). **Seed biology.** New York: Academic Press, 1972. p. 145-245.
- IPGRI. **Genebank standards.** Rome: International Plant Genetic Resources Institute: FAO, 1994. 13 p.
- KARTHA, K. K. (Ed.). **Cryopreservation of plant cell and organs.** Boca Raton: CRC Press Inc, 1985. 276 p.
- MEDEIROS, A. C. S.; CZARNESKI, C. M.; FREITAS, G. F. Criopreservação de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr.All.) Engl.) **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 4, p. 544-547, 1992.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, p. 499-514, 1973.

SALOMÃO, A. N. Effects of liquid nitrogen storage on *Ziziphus joazeiro* seeds. **Cryo-Letters**, Cambridge, UK, v. 16, p. 85-90, 1995.

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 Resources. **IBPGR Advisory Committee on Seed Storage**, Roma, 1984. p. 8-27.

STANWOOD, P. C. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: KARTHA, K. K. (Ed.). **Cryopreservation of plant cell and organs**. Boca Raton: CRC Press Inc, 1985. p. 200-266.

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

STANWOOD, P. C.; ROOS, E. E. Seed storage of several horticultural species in liquid nitrogen (-196°C). **Hortscience**, Alexandria, VA, v. 14, p. 26-31, 1979.

UNEP. **Conservation on biological diversity**. Rio de Janeiro, 1992. 224 p. (Na. 92-7807).

WETZEL, M. M. V. S. **Época de dispersão e fisiologia de sementes do Cerrado**. 1997. 167 f. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília.

### Circular Técnica , 26

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 (2003): 150 unidades

### Comitê de publicações

**Presidente:** José Manuel Cabral de Sousa Dias  
**Secretário-Executivo:** Maria José de Oliveira Duarte  
**Membros:** Maurício Machaim Franco  
Regina Maria Dechechi G. Carneiro  
Luciano Lourenço Nass  
Sueli Correa Marques de Mello  
Vera Tavares Campos Carneiro

### Expediente

**Supervisor editorial:** Maria José de Oliveira Duarte  
**Normalização Bibliográfica:** Maria Alice Bianchi  
**Editoração eletrônica:** Giscard Matos de Queiroz