

CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE AROEIRA (*ASTRONIUM URUNDEUVA* (FR. ALL.) ENGL.)

Antonio Carlos de S. MEDEIROS¹
Claudia Morosi CZARNESKI²
Gyssia Faraco de FREITAS³

RESUMO

O objetivo deste estudo foi o de verificar o comportamento das sementes de aroeira (*Astronium urundeuva*) após cinco meses de armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C). As sementes provenientes de oito árvores foram misturadas de forma a constituir um único lote. O lote foi dividido em amostras, submetidas à secagem por 0,96 e 144 hs a 25°C e 15% UR, após o que foi determinado o grau de umidade das sementes e o seu poder germinativo antes e depois da conservação em nitrogênio líquido por 30, 90 e 150 dias. Verificou-se que após os períodos de armazenamento, as sementes continuavam viáveis, concluindo-se, pois, que a criopreservação é um método promissor para a conservação das sementes dessa espécie em bancos de germoplasma e que as sementes devem ser desidratadas ao grau de 6% de umidade.

Palavras-chave: Aroeira *Astronium urundeuva*; criopreservação, secagem, sementes ortodoxas.

ABSTRACT

The purpose of this paper is to report the behavior of *Astronium urundeuva* (aroeira) seeds after storage in liquid nitrogen at -196°C for five months. Seeds were collected from eight trees and mixed to form a single sample. Sub-samples were dried for 0,96 and 144 hours at 25°C and 15% Rh. Seed humidity, as well as germination before and after storage in liquid nitrogen for 30, 90 and 150 days were measured. It was found that seeds remained viable after all of the above storage periods. It was concluded that cryopreservation is a promising method for the conservation of seeds of this species in gene banks after being dehydrated to 6% humidity.

Key words: Aroeira, *Astronium urundeuva*, cryopreservation, drying, orthodox seeds.

1 INTRODUÇÃO

A conservação de sementes em nitrogênio líquido oferece inúmeras vantagens e se destaca sobre os demais métodos de conservação por garantir preservação indefinida do germoplasma armazenado. Baseado em Fedosenko & Yuldasheva (1976), Harrison & Carpenter (1977), Mumford & Grout (1978) e em Stanwood & Bass (1978), cita STANWOOD (1980), que o uso de nitrogênio líquido a -196°C tem sido sugerido como meio de conservação potencial para germoplasma - semente a longo prazo -, visto que as atividades bioquímicas que eventualmente resultam em danos às células e em declínio na viabilidade das sementes, presumivelmente, poderiam ser inibidas na temperatura do nitrogênio líquido. STYLES et alii (1982), estudando o armazenamento de sementes de 24 espécies de hortaliças em nitrogênio líquido, observaram que este sistema tem vantagens sobre o método convencional, principalmente na ausência de controles complicados

de temperatura e umidade, redução do ataque de pragas e doenças e tempo indefinido com pequena ou nenhuma mudança genética.

STANWOOD & BASS (1981) afirmam que a necessidade da criopreservação tornou-se evidente quando foram detectadas as deficiências existentes nos sistemas convencionais para conservação a longo prazo. Eles citam que o metabolismo ainda ocorre e a viabilidade das sementes eventualmente declina quando armazenadas pelo sistema sugerido pelo International Board for Plant Genetic Resources - IBPGR (1976), ou seja, a -20°C e grau de umidade das sementes entre 4 e 6%, conforme ELLIS et alii (1985).

Dando continuidade a um trabalho anterior sobre conservação de germoplasma de aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engl.) - germinação de sementes após imersão em nitrogênio líquido - MEDEIROS & CAVALLARI (1991), no qual as sementes de aroeira foram classificadas como ortodoxas conforme definição de ROBERTS (1973) e se estudou a germinação das

(1) Pesquisador da EMBRAPA-CENARGEM, Área de Conservação de Recursos Genéticos - ACRG, Caixa Postal 02372, CEP 70770, Brasília, DF, Brasil.

(2) Estudante do Curso de Engenharia Florestal, UnB, Bolsista Iniciação Científica, CNPq/EMBRAPA-CENARGEM-ACRG.

(3) Estudante do Curso de Engenharia Florestal, UnB. Estagiária no CENARGEM-ACRG..

sementes imediatamente após imersão em nitrogênio líquido, buscou-se, neste, a investigação relativa à conservação propriamente dita, com o objetivo de se verificar o comportamento das sementes através do teste de germinação, após períodos de 30, 90 e 150 dias de imersão em nitrogênio líquido.

Alguns trabalhos já foram realizados em criopreservação com outras espécies. STANWOOD (1980), estudando a tolerância de sementes de 29 diferentes espécies ao resfriamento e armazenamento em nitrogênio líquido, verificou que o germoplasma de várias espécies pode ter uma preservação prolongada em criopreservação. As sementes foram embaladas em envelopes herméticos e posteriormente imersas em nitrogênio líquido e ficaram armazenadas durante 7, 30 e 180 dias, sendo posteriormente removidas e descongeladas à temperatura ambiente. Estudando o armazenamento de sementes em nitrogênio líquido, STYLES et alii (1982) observaram após 600 dias que, em média, não ocorreram mudanças consideráveis na germinação e que não houve também nenhum tipo de deterioração das sementes de 24 diferentes espécies de hortaliças.

MUMFORD & GROUT (1978) estudaram a germinação e o armazenamento de sementes de *Manihot esculenta* em nitrogênio líquido. Especialmente em relação ao teor de umidade das sementes, foi verificada uma redução no poder germinativo de 80 para 23% nas sementes com teor de umidade inicial de 6,34%. Os autores presumem que esta queda se deva ao teor de umidade das sementes, visto que em estudos posteriores onde, o grau de umidade foi reduzido para 2%, esta redução do poder germinativo não ocorreu, não havendo, assim, perda de viabilidade.

Ainda em relação ao grau de umidade da semente, STANWOOD (1980) cita que este é o fator mais crítico no sucesso da criopreservação. Se a semente atingir níveis de umidade entre 4 e 6%, o sucesso da criopreservação estará garantido, pois as sementes com grau de umidade elevado quando submetidas a temperaturas abaixo de zero apresentam expansão de seus tecidos devido ao congelamento da água e posterior ruptura levando-as à morte. Cita TEIXEIRA (1990) em sua revisão de literatura que, segundo Olien (1971), Sakai (1971) e Barnhart & Terry (1971), as injúrias causadas às células por ocasião do congelamento se devam à formação de cristais de gelo no espaço confinado intracelular, que conduz à ruptura mecânica tanto da estrutura citoplasmática quanto da membrana plasmática, resultando na desagregação celular.

Sementes de tomate, que são conhecidas por terem uma boa aceitação às condições de armazenamento, mostraram, segundo STANWOOD & BASS (1981), um decréscimo de 0,4% ao ano na germinação utilizando-se as condições de armazenamento impostas pelo Laboratório Nacional de Armazenamento de Sementes - NSSL, Forte Collins, Colorado, USA (0-5° C e 40 - 50% UR). Verificaram ainda que não somente o tomate mas outras espécies apresentaram decréscimo na germinação como: trigo (0,8%/ano) e sorgo (1,0%/

ano). Quando um decréscimo significativo na viabilidade é detectado, a amostra deve ser trocada por outra com alto poder germinativo.

Da mesma forma que em Forte Collins, as sementes de aroeira armazenadas no CENARGEN correm o risco de perderem também lentamente a sua viabilidade, já que ainda estão sendo armazenadas, conforme CAVALLARI & SALOMÃO (1991), a 5°C e 30% UR.

Preocupados não só com os resultados observados por STANWOOD & BASS (1981) como também em apontar uma metodologia alternativa para conservação de sementes de aroeira, instalou-se o presente experimento, que tem como objetivo principal verificar o comportamento das sementes desta espécie após imersão em nitrogênio líquido (-196°C) e ao longo de cinco meses de armazenamento.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido durante o período 1990-1991, utilizando as instalações do Laboratório de Controle de Qualidade do Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN, com sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engl.), colhidas em setembro de 1989 de oito árvores existentes nos Estados da Bahia e Piauí (9 - 12° lat. e 44 - 46° long.) e armazenadas em câmara a 5°C e 30% UR por dez meses, em embalagem permeável de papel Kraft.

As sementes foram misturadas de forma a constituir um único lote e submetidas aos seguintes testes ou processos:

a) **Secagem:** o lote foi dividido em amostras de trabalho, acondicionadas em pequenos sacos de filô e levadas à câmara de secagem (25°C e 15% UR), com circulação de ar, onde permaneceram por dois períodos de tempo: 96 e 144 horas. Houve um tratamento, testemunha, que não foi submetido à secagem.

b) **Determinação do grau de umidade:** para determinação do grau de umidade, foram utilizadas duas repetições de aproximadamente 4,5 gramas de sementes colocadas para secar em estufa previamente aquecida a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 24 horas na base do peso úmido conforme prescrevem as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1980).

c) **Germinação:** foi conduzida em oito repetições de vinte e cinco sementes para cada unidade experimental, em germinador automático da marca Stults, regulado para temperatura alternada de 20 - 30° C, com presença de luz por oito horas na temperatura mais elevada e escuro por dezesseis horas na temperatura mais baixa. Foram utilizadas duas folhas de papel de filtro como substrato, colocadas em caixas plásticas do tipo Gerbox. As contagens foram efetuadas aos cinco e oito dias após a semeadura, de acordo com MEDEIROS & CAVALLARI (1991).

d) **Criopreservação:** as amostras que passaram pelos períodos de secagem foram imediatamente acondicionadas em embalagem hermética constituída por envelopes trifoliolados de papel, alumínio e polietileno,

com fechamento a calor. Em etapa seguinte, as embalagens foram inseridas em "canisters" de aço inox e lentamente imersas diretamente em nitrogênio líquido a -196°C, conforme STANWOOD (1980). Decorridos os períodos de 30, 90 e 150 dias de armazenamento, os "canisters" foram retirados do tambor e colocados em ambiente de laboratório por 30 minutos para descongelamento natural, tempo necessário e suficiente para que ocorresse um equilíbrio com a temperatura ambiente. Após o descongelamento, efetuou-se novamente o teste de germinação a fim de comparar seus resultados com o teste realizado antes da imersão em nitrogênio líquido.

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com três repetições. Os resultados dos testes de germinação foram transformados em arco seno da $\sqrt{\%/100}$. A comparação entre as médias foi efetuada através do teste de Tukey, aos níveis de 1 e 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios obtidos nos testes de germinação, apresentados na TABELA 1, permitem constatar que os tratamentos 0, 96, e 144 horas de exposição das sementes às condições impostas pela câmara de secagem não diferem estatisticamente entre si, revelando, assim, que a secagem não afetou a germinação. Verifi-

TABELA 1 - Valores médios de germinação obtidos após períodos de secagem

SECAGEM (hs)	GERMINAÇÃO (%) ¹	TEOR DE UMIDADE (%)
0	70aA	11,70
96	74aA	6,21
144	74aA	6,07

DMS 1% = 5,113
DMS 5% = 4,066
Coeficiente de variação = 10,037%

(1) Nas colunas, as médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade e pelas mesmas letras maiúsculas não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey

TABELA 2 - Porcentagem de germinação de sementes de aroeira antes e após armazenamento por 30, 90 e 150 dias em nitrogênio líquido (-196°C)

SECAGEM (hs)	UMIDADE %	GERM. INICIAL (%)	GERM. APÓS CRIOPRES. (%)		
			30	90	150
0	11,70	70	-	-	-
96	6,21	74	48	55	56
144	6,07	74	61	86	73

ca-se que a germinação foi maior nos tratamentos submetidos à desidratação, possivelmente devido ao controle exercido pela operação de secagem aos fungos saprófitas existentes - CZARNESKI & MEDEIROS (1991) - e que podem interferir, segundo CARNEIRO (1987), negativamente nos testes de germinação.

Analisando-se a TABELA 2, onde estão contidos os resultados dos testes de germinação antes e após armazenamento das sementes em nitrogênio líquido por 30, 90 e 150 dias, verifica-se que ocorreu um decréscimo na germinação para o tratamento relativo à secagem por 96 horas e submetidas a criopreservação, quando comparado ao tratamento testemunha, que não foi submerso no nitrogênio líquido, sugerindo que o fato ocorreu devido ao grau de umidade da semente ter sido elevado (6,21%) para esta espécie. Não foram constatadas mudanças consideráveis na germinação das sementes submetidas a 144 horas de secagem e armazenadas posteriormente em nitrogênio líquido. Observa-se ainda na TABELA 2 que não foram submetidas aos efeitos do nitrogênio líquido as sementes não desidratadas. Os autores se respaldaram nas observações constatadas por Olien (1971), Sakai (1971), Barnhart & Terry (1971), citados por TEIXEIRA (1990), de que as sementes sofreriam injúrias irreparáveis provocadas pela formação de cristais de gelo no espaço intracelular. De acordo com a TABELA 2, as médias obtidas para germinação após 30, 90 e 150 dias em criopreservação são superiores para os tratamentos submetidos a 144 horas de secagem, quando comparadas com os de 96 horas, sugerindo que além dos efeitos positivos da operação de secagem sobre os fungos saprófitas ainda se deva ao conteúdo de umidade das sementes, pois a germinação foi maior no tratamento com 144 horas de secagem, correspondente a 6,07% de umidade das sementes. Segundo STANWOOD (1980), o grau de umidade da semente é o fator mais crítico no sucesso da criopreservação. Os resultados também concordam com os obtidos por MUMFORD & GROUT (1978), que destacam a importância da secagem a níveis adequados à espécie para o posterior armazenamento das sementes em nitrogênio líquido (-196°C).

4 CONCLUSÕES

A criopreservação é um método de armazenamento promissor para aroeira, sugerindo-se desidratação prévia das sementes ao grau de umidade de 6%.

Ao final de 5 meses de armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C), as sementes de aroeira continuaram viáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL, Ministério da Agricultura., 1980. *Regras para análise de sementes*, Brasília, DF, Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária - SNAD, LANARV, 188 p.
- CARNEIRO, J. S., 1987. Testes de sanidade de sementes de essências florestais. In: *PATOLOGIA DE SEMENTES*, Campinas, SP, 1987. SOAVE, J. & WETZEL, M. M. V. da S., ed., ABRATES, Fundação Cargill cap. XVII, 386 - 394.
- CAVALLARI, D. A. N. & SALOMÃO, A. N., 1991. Qualidade de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engler) armazenadas sob condições diversas. In: *INFORMATIVO ABRATES*, Brasília, DF, setembro 1991. Número especial, v.1, nº.4, p.90 (Resumo 140).
- CZARNESKI, C. M. & MEDEIROS, A. C. de S., 1991. Efeito da secagem no controle de fungos associados às sementes de aroeira (*Astronium urundeuva*) In: *INFORMATIVO ABRATES*, Brasília, DF, setembro 1991. Número especial, v.1, nº 4, p.88.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D. & ROBERTS, E. H., 1985. *Handbook of seed technology for genebanks: Volume I, principles and methodology*. 3v. Rome: IBPGR, 1985. Nº2: *Handbooks for genebanks*. 210 p.
- MEDEIROS, A. C. de S. & CAVALLARI, D. A. N., 1991. Conservação de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engl.) em nitrogênio líquido. In: *CONGRESSO NACIONAL BOTÂNICA*, Goiânia, GO, 20 - 26 de Janeiro, 1991. RESUMOS, Sociedade Botânica do Brasil, UFG, 42C, p. 340.
- MUMFORD, P. M. & GROUT, B. W. W., 1978. Germination and liquid nitrogen storage of cassava seed. *Annals of Botany*, London, UK, v.42, 255-257.
- ROBERTS, E. H., 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology*, Zürich, Switzerland, 1: 499-514.
- STANWOOD, P. C., 1980. Tolerance of crop cooling and storage in liquid nitrogen (-196°C). *Journal of Seed Technology*, Lansing, Michigan, USA, v.5, n.1, 26-31.
- STANWOOD, P. C. & BASS, L. N., 1981. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. *Seed Science and Technology*, Zürich, Switzerland, v.9, n.1, 432-437
- STYLES, E. D.; BURGESS, J. M.; MASON, C. & HUBER, B. M., 1982. *Cryobiology*, San Diego, USA, v.19, 195-199.
- TEIXEIRA, S. L., 1990. Criopreservação de germoplasma vegetal. In: *ABCTP Notícias* 2-6, Brasília, DF, 1990.